

# 塩酸バンコマイシンの新規配合製剤におけるバンコマイシン誘発腎毒性に対する添加物の影響

著者	程島 直子
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	星薬科大学
学位授与年度	2008年度
学位授与番号	32676乙第170号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1240/00000275/">http://id.nii.ac.jp/1240/00000275/</a>

塩酸バンコマイシンの新規配合製剤における  
バンコマイシン誘発腎毒性に対する添加物の影響

2008年

程 島 直 子

# 目 次

緒 言	1
第 I 章 塩酸バンコマイシンの新規配合製剤	3
第 1 節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の製剤特性	4
第 2 節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の安全性	5
第 3 節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態	11
第 4 節 考察	16
第 5 節 小括	18
第 II 章 バンコマイシン誘発腎毒性に対する添加物の影響	19
第 1 節 腎障害モデルの作製及び選択	19
1. 薬剤性腎障害モデルの作製	19
2. 薬剤性腎障害モデルによる薬物動態評価	21
3. 慢性腎不全モデル（5/6 腎摘出ラット）の作製	24
第 2 節 慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用 バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態	26
第 3 節 慢性腎不全モデルラットにおけるバンコマイシン誘発 腎毒性の病態生理学的解析	31
第 4 節 考察	33
第 5 節 小括	38
総 括	39
謝 辞	41

実験の部	42
第Ⅰ章 実験の部	42
Ⅰ－１．マクロゴール 400 による VCM のヒスタミン遊離抑制作用	42
Ⅰ－２．点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態	43
第Ⅱ章 実験の部	45
Ⅱ－１．薬剤性腎障害モデルの作製	45
Ⅱ－２．薬剤性腎障害モデルによる薬物動態評価	46
Ⅱ－３．慢性腎不全モデルの作製	48
Ⅱ－４．慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用バンコマイシン シン 0.5「MEEK」の薬物動態	48
引用文献	51

## 論文リスト

本研究の内容は以下の論文に基づくものである。

- 1) Protective effect of inactive ingredients against nephrotoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. : N.Hodoshima, Y.Nakano, M.Izumi, N.Mitomi, Y.Nakamura, M.Aoki, A.Gyobu, S.Shibasaki and T.Kurosawa, Drug Metabol. Pharmacokin., 19(1), 68-75 (2004) .  
→ 第Ⅰ章 第2節及び第3節点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の安全性及び薬物動態の項に使用した。
- 2) NM441 の腎排泄機構と腎障害ラットにおける体内動態の検討：芝崎茂樹、栗林尚志、程島直子、仲由武實、日本化学療法学会雑誌、44(S-1), 165-172 (1996) .  
→ 第Ⅱ章 第1節 1. 薬剤性腎障害モデルの作製及び 2. 薬剤性腎障害モデルによる薬物動態評価の項に使用した。
- 3) Decreased renal accumulation and toxicity of a new VCM formulation in rats with chronic renal failure. : N.Hodoshima, S.Masuda and K.Inui, Drug Metabol. Pharmacokin., 22(6), 419-427 (2007) .  
→ 第Ⅱ章 第1節 3. 慢性腎不全モデル（5/6 腎摘出ラット）の作製、第2節及び第3節慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態及び病態生理学的解析の項に使用した。

## 略語リスト

バンコマイシン塩酸塩 (VCM)

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

薬物血中濃度モニタリング (Therapeutic Drug Monitoring ; TDM)

点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」 (MEEK)

塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5g (S-VCM)

MEEK に使用される原薬 (M-VCM)

5/6 腎摘出ラット (5/6Nx)

ヘマトキシリン・エオシン染色 (H-E 染色)

血中尿素窒素 (BUN)

クレアチニン ( $C_{re}$ )

血漿クレアチニン (P- $C_{re}$ )

尿中クレアチニン (U- $C_{re}$ )

クレアチニークリアランス ( $C_{cr}$ )

尿中総乳酸脱水素酵素 (T-LDH)

尿中総 N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミン (T-NAG)

半減期 ( $T_{1/2}$ )

血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC)

全身クリアランス ( $CL_{tot}$ )

定常状態分布容積 ( $V_{d_{ss}}$ )

腎クリアランス ( $CL_r$ )

腎外クリアランス ( $CL_{nr}$ )

糸球体ろ過速度 (GFR)

## 緒 言

塩酸バンコマイシン（Vancomycin Hydrochloride；以下 VCM）は *Streptomyces orientalis* から分離されたグリコペプチド系抗生物質であり、好気性及び嫌気性のグラム陽性菌に対して殺菌的に作用する。特に methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*（以下 MRSA）に対して優れた抗菌力を有し、抗 MRSA 薬として高く評価されている<sup>1)</sup>。また、VCM は優れた治療効果を有する反面、腎障害、red neck 症候群などの副作用が報告されており、その使用は個々の患者に応じた投与計画が必要とされ、薬物血中濃度モニタリング（以下 TDM）の対象とされている<sup>2-4)</sup>。

VCM は Eli Lilly 社により開発され、米国において 1958 年「グラム陽性菌による感染症」に対して静脈内投与、1960 年「黄色ブドウ球菌性大腸炎」及び 1980 年「*Clostridium difficile* による偽膜性大腸炎」に対して経口投与がそれぞれ承認された。その後多くの国々で承認され、日本では 1981 年に経口剤、1991 年に MRSA 感染症に対し注射剤が開発され承認された。

これら VCM 製剤が汎用されるに伴い、特に注射剤において、その溶解操作が煩雑であることから医療現場より製剤の改良が望まれた。すなわち、VCM は溶解過程においてゲルを形成しやすいという物理化学的特性を有し<sup>5, 6)</sup>、その調製に時間を要するという欠点があった。そこで著者らは明治製菓(株)薬剤研究所において溶解性の改善及び製剤の安定化を目的として製剤検討を開始した。その結果、500 mg 力価の VCM に対し D-マンニトール及びマクロゴール 400 をそれぞれ 100 mg ずつ配合した凍結乾燥製剤、点滴静注用バンコマイシン 0.5 「MEEK」（以下 MEEK）を開発し、2002 年に明治製菓(株)及び小林化工(株)のジェネリック医薬品として上市した<sup>7, 8)</sup>。

著者はこの VCM の新規配合製剤の開発過程において安全性について検討したところ、MEEK に配合された添加物 D-マンニトール及びマクロゴール 400 が、VCM の腎毒性を軽減する効果があることを見出した<sup>9)</sup>。さらにその現象を検証することと、得られた知見の臨床的意義を追及することを目標として研究

を行った。(以下、VCMの量を力価換算した値として示す。)

第I章では、MEEKの製剤特性、安全性及び薬物動態について、VCMの先発医薬品である塩酸バンコマイシン点滴静注用0.5g(以下S-VCM)と比較検討した結果を報告する。すなわち、MEEKは、添加物としてD-マンニトール及びマクロゴール400を配合したことにより、溶解性及び安定性が改善された凍結乾燥製剤である<sup>8)</sup>。その安全性及び薬物動態について正常ラットを用いS-VCMと比較したところ、VCMとして1日臨床用量(40 mg/kg)を投与した場合には、両製剤に差は認められなかったが、腎毒性発現用量(400 mg/kg)を投与した場合において、VCMの腎機能と腎組織への影響及び薬物動態に差が認められ、MEEKに配合された添加物は、VCMの腎毒性を軽減することが確認された<sup>9,10)</sup>。

第II章では、これら添加物の腎毒性軽減効果に関する検証と、その臨床的意義について検討した結果を報告する。すなわち、著者は、この腎毒性軽減効果の主な要因がVCMの腎への蓄積抑制であると仮定するならば、腎機能低下時にはより顕著な効果を確認できるのではないかという仮説を立て、MEEKとS-VCMの病態生理学的及び薬物動態学的な比較検討を行った。著者は、本研究を進めるにあたり、まず腎機能障害モデルの評価系を検討し、慢性腎不全モデルである5/6腎摘出ラット(以下5/6Nx)が評価系として妥当であることを確認した。5/6Nxを用いてMEEKとS-VCMの病態生理学的及び薬物動態学的な解析を行った結果、この5/6Nxを用いることにより、薬剤による病理組織学的変化が殆ど進行しない投与量の範囲内で、両製剤における薬物動態の差を確認することができた。すなわち、MEEKは、VCM誘発の腎毒性軽減効果を有し、臨床において薬剤性腎毒性の増悪を防止することが推察された<sup>11)</sup>。

薬剤性臓器障害の三大障害(肝障害、腎障害、骨髄障害)<sup>12)</sup>の一つである腎障害は、医薬品の適正使用において非常に重要な課題である。抗MRSA薬の代表的薬剤であるVCM製剤において、VCMによる腎毒性を軽減する効果が確認されたことは、臨床において非常に大きな意義のあることと考える。



# 第 I 章 塩酸バンコマイシンの新規配合製剤

VCM は *Streptomyces orientalis* から分離されたグリコペプチド系抗生物質で、MRSA に対して優れた抗菌力を有する。VCM は Fig. I-1 に示す構造を有しており、水に対して高い溶解度<sup>13, 14)</sup>を示すものの、12%以上の濃度においてゲルを形成しやすい性質を有する。このことから、点滴静注用製剤の溶解液は注射用水に制限されている<sup>5, 6)</sup>。このような VCM の物理化学的特性のためその溶解操作が煩雑となり、医療現場から製剤の改良が望まれた。そこで、著者らはそのニーズに応えるため、溶解性の改善及び製剤の安定化を目的に製剤検討を開始した。その結果、500 mg の VCM に対し D-マンニトール及びマクロゴール 400 をそれぞれ 100 mg ずつ配合した凍結乾燥製剤 MEEK を開発した<sup>7, 8)</sup>。

本章では、まず、MEEK の製剤特性について示し、次に、その安全性について病態生理学的及び薬物動態的解析を行った結果につき論述する。

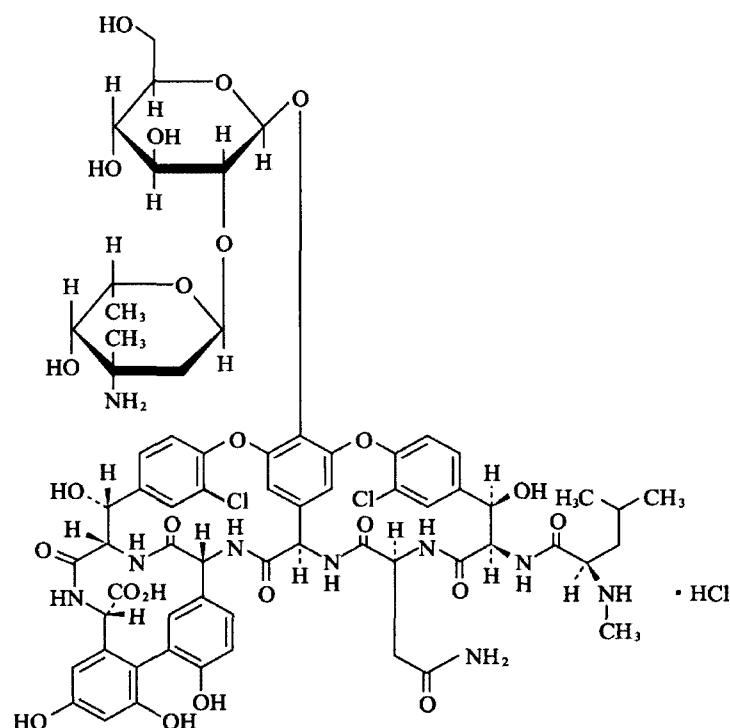


Fig. I -1 Chemical structure of vancomycin hydrochloride

## 第1節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の製剤特性

新規配合製剤では、溶解過程での主薬のゲル形成を回避する観点から、賦形剤の添加により原薬を希釈し、局所的な薬物濃度の上昇を抑制するとともに、水の浸潤を容易にする添加物の配合が検討された。さらに、製剤の安定化にも寄与しうる添加物を選定した結果、VCM500 mg に対し D-マンニトール及びマクロゴール 400 をそれぞれ 100 mg ずつ配合することにより、優れた製剤特性を有する凍結乾燥製剤、MEEK が得られた。

溶解液に注射用蒸留水、生理食塩液（以下生食）または 5%ブドウ糖注射液を用いたときの製剤の溶解性は並木らによって報告され<sup>15)</sup>、MEEK はいずれの溶解液を用いても速やかに溶解し、溶解所要時間は S-VCM よりも有意 ( $P<0.05$ ) に短かった (Table I-1)。なお、S-VCM では添付文書の薬液調製方法に従い、注射用蒸留水のみで評価されている。

Table I -1 Time required for reconstitution of each VCM formulation<sup>15)</sup>.

Formulation	Diluent for reconstitution	Time required for reconstitution (min)
MEEK	Distilled water for injection	12.2 ± 4.3
	Physiological saline	12.8 ± 2.7
	5% Glucose for injection	12.5 ± 2.8
S-VCM	Distilled water for injection	24.2 ± 8.9

(Mean±S.D., n=8)

次に、各種保存条件下における MEEK の安定性を Table I-2 に示した。D-マンニトール及びマクロゴール 400 は加速保存試験において各々異なる類縁物質の増加を抑制しており（データ未提示）、原薬のみで調製した凍結乾燥製剤よりも安定であった。また、長期保存試験において 3 年以上安定であることから、本剤の使用期限は室温保存で 3 年間と定められた。なお、S-VCM の使用期限は 2 年とされている。

Table I -2 Stability of VCM for IV infusion 0.5 MEEK under various storage conditions.

Formulation	Stability test	Storage conditions	Storage period	Description	Residual potency (%)
MEEK	Stress test	60°C	30 days	No change	96.6
		50°C	30 days	No change	98.1
		Room temperature, 1,000 Lux	50 days	No change	99.7
	Accelerated test	40°C,75%RH	6 months	No change	99.6
		30°C,60%RH	12 months	No change	99.3
	Long-term test	25°C,60%RH	39 months	No change	98.5
Control *	Accelerated test	40°C,75%RH	6 months	Change to pale brown	93.1

\*: Freeze-dried pharmaceutical preparation containing the drug substance alone

## 第2節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の安全性

S-VCM は原薬の凍結乾燥製剤であるのに対し、MEEK には添加物が配合されていること、また、VCM は発酵生産物であり類縁物質を比較的多く含むため、原薬ソース（製造元）により安全性が異なる可能性があることから、添加物及び MEEK の安全性について評価した。

MEEK に配合された D-マンニトール及びマクロゴール 400 は化学的に安定であり、かつ、安全性が高いことから医薬品添加物として汎用されており、静注経路での最大使用量はそれぞれ 1 日あたり 9000 mg 及び 3200 mg である<sup>16)</sup>。MEEK の 1 日臨床用量（VCM として 2 g）での両添加物の摂取量は共に 400 mg となり、医薬品添加物としての適正な使用量の範囲にある。マクロゴール 400 は低分子量（平均分子量；約 380～420）ながら重合体であること<sup>16)</sup>からその抗原性を評価した。マクロゴール 400 はマウス IgE 抗体産生能試験及びモルモット抗原性試験において共に陰性であり（データ未提示）、臨床上重篤なアナフィラキシー症状を発現する可能性は低いと考えられた。また、マクロゴール 400

はアドリアマイシンによる肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することが報告されている<sup>17)</sup>。VCM も red neck 症候群の原因となるヒスタミン遊離作用を有することから<sup>6, 18)</sup>、ラット腹腔肥満細胞を用いて検討した結果、マクロゴール 400 は VCM によるヒスタミン遊離を用量依存的に抑制することが確認された (Fig. I -2)。

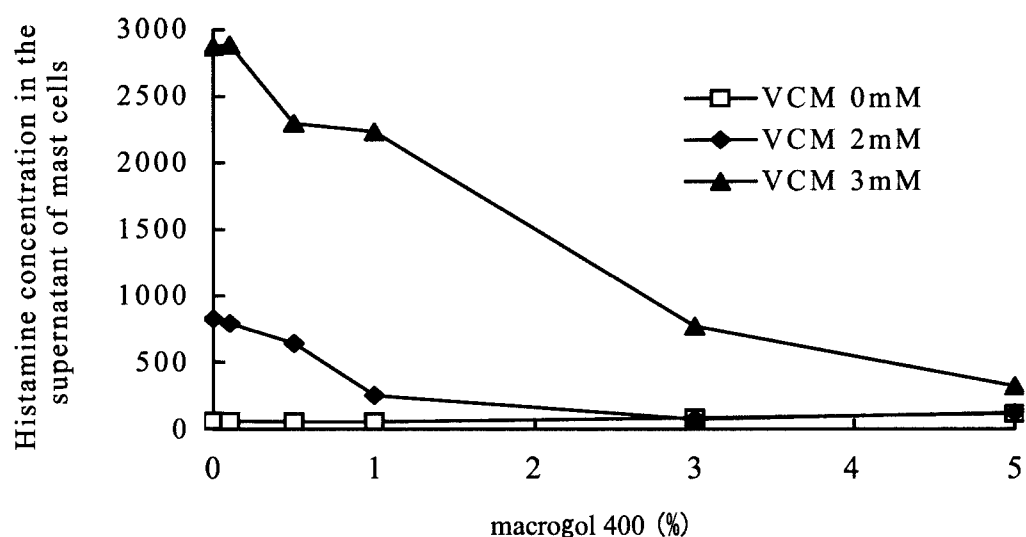


Fig. I -2 Inhibitory effect of macrogol 400 on VCM-induced histamine release (n=2)

次に、正常ラットに各被験製剤をそれぞれ VCM として腎毒性発現用量（400 mg/kg）を静脈内投与したときの血液生化学検査及び尿検査の結果を Fig. I -3 及び 4 に示した。MEEK に使用される原薬（M-VCM）投与群及び VCM の先発医薬品（S-VCM）投与群の血中尿素窒素（BUN）及び尿中総乳酸脱水素酵素（T-LDH）は、コントロール群と比較していずれも有意に高かった。また、有意な差はないものの尿中総 N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミン（T-NAG）の上昇傾向が認められた。一方、MEEK 群及び S-VCM に MEEK 同様の添加物を配合した製剤 S-VCMPM 群の BUN はコントロール群とほぼ同等であり、T-LDH 及び T-NAG は、M-VCM 群及び S-VCM 群に比べて低値あるいは低値傾向を示した。これらの傾向は、D-マンニトールまたはマクロゴール 400 を単独で製剤に配合した場合にも、2 種併用時と同程度の現象が認められている（データ未提示）。その機序の詳細は不明ながら、MEEK に配合された両添加物は VCM の腎毒性を軽減することが示唆された。

腎臓のヘマトキシリン・エオシン染色（H-E 染色）標本について光学顕微鏡下で観察したところ、病理組織学的には、M-VCM 群及び S-VCM 群共に、尿細管上皮細胞の変性・壊死、尿細管拡張、尿円柱の出現及び尿細管上皮細胞の好塩基性変化が認められた。また極めて軽度ではあるが糸球体の肥大とボーマン腔の拡張及びボーマン腔内における好酸性物質の存在が認められた。一方、添加物が配合された MEEK 群及び S-VCMPM 群では、殆どの個体で明確な変化は認められなかった（Fig. I -5 及び Fig. I -6）。

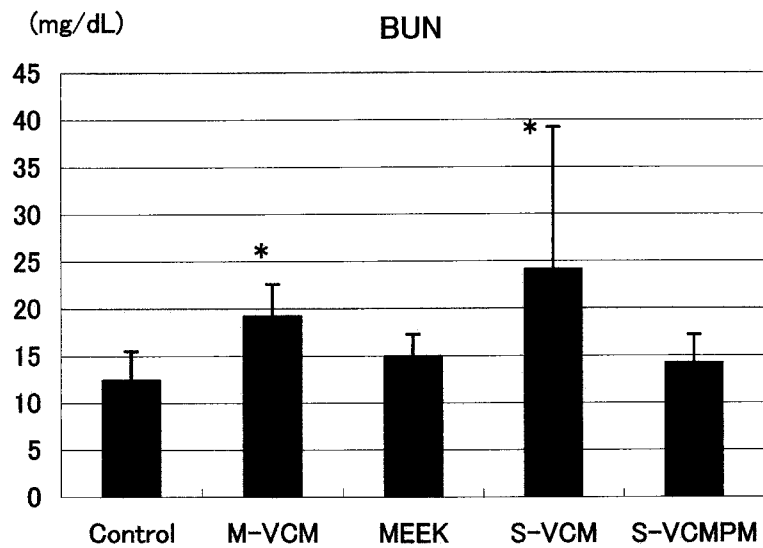


Fig. I -3 BUN levels in rats treated with intravenous M-VCM, MEEK, S-VCM or S-VCMPM. (Dose: 400 mg/kg, Mean $\pm$ S.D., n= 5)  
\*: P< 0.05 significantly different from control.

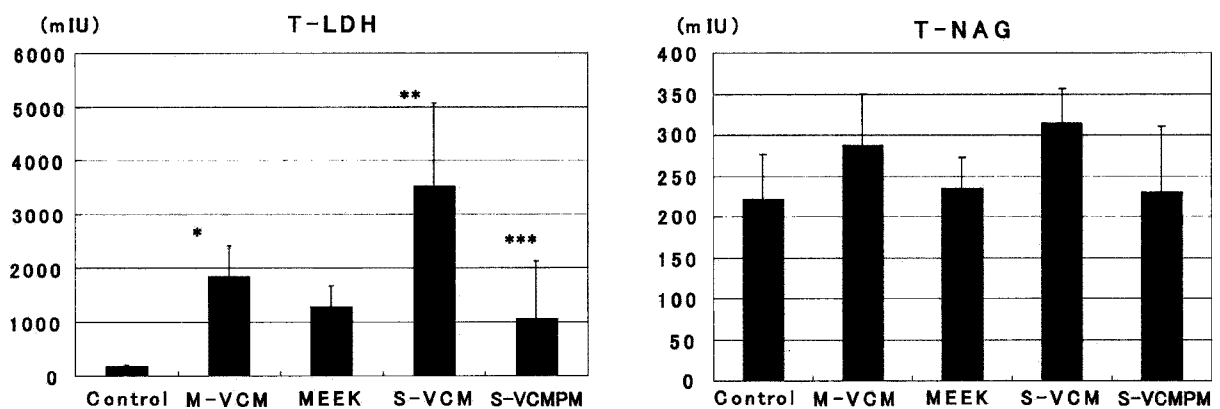


Fig. I -4 Urinalysis in rats treated with intravenous M-VCM, MEEK, S-VCM or S-VCMPM. (Dose: 400 mg/kg, Mean $\pm$ S.D., n= 5)  
\*: P<0.05 , \*\*: P<0.01 significantly different from control.  
\*\*\*: P<0.05 significantly different from S-VCM.

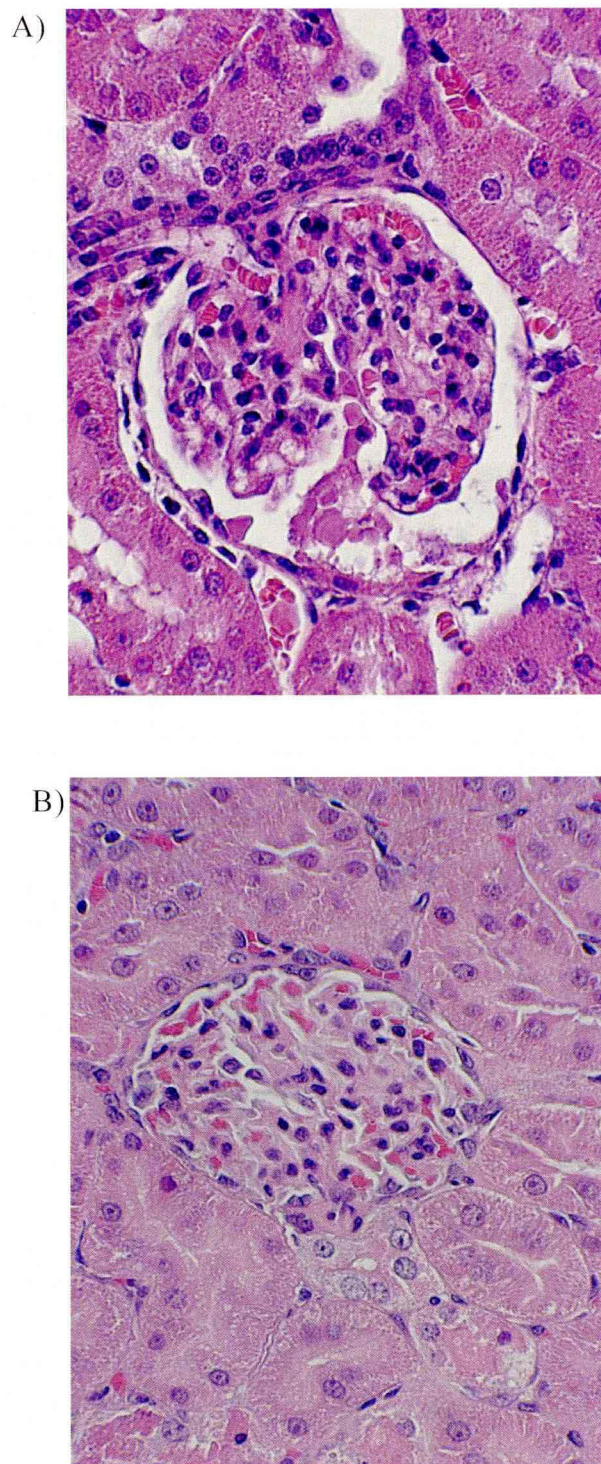


Fig. I -5 Glomeruli shown by H-E staining of rat kidneys after intravenous administration of S-VCM or MEEK (Dose: 400 mg/kg). A) Dilatation of Bowman's space, which contains protein-like material in the lumen and hypertrophy of the glomeruli in an S-VCM-treated rat. B) The kidney is almost normal in the MEEK-treated rat.



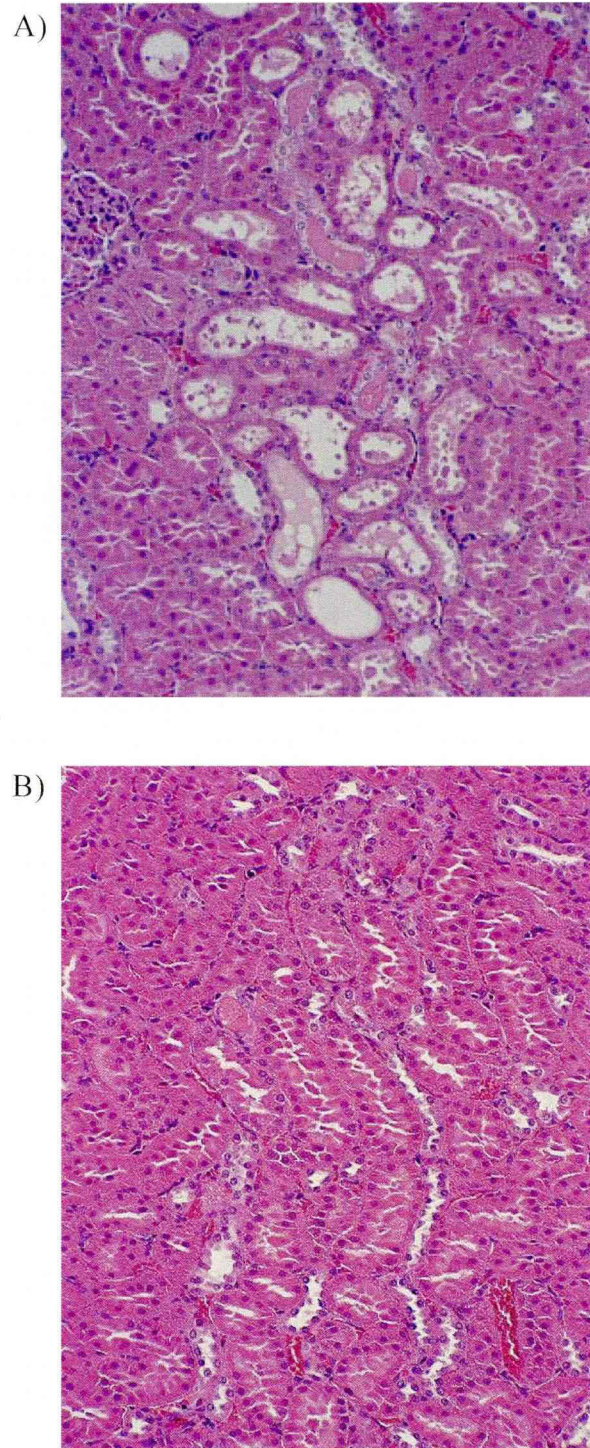


Fig. I -6 Renal cortical tubules shown by H-E staining of rat kidneys after intravenous administration of M-VCM or MEEK (Dose:400 mg/kg). A) Dilatation of renal tubules, necrosis, or degeneration of the tubular epithelium, and luminal hyaline casts in an M-VCM-treated rat. B) The kidney is almost normal in the MEEK-treated rat.



### 第3節 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態

MEEK 及び S-VCM の 1 日臨床用量 (40 mg/kg) 及び腎毒性発現用量 (400 mg/kg) をラットにそれぞれ静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移を Fig. I -7 に示した。40 mg/kg 投与では、両製剤の血漿中濃度はほぼ同様に推移し、投与 6 時間後では測定限界以下となった。一方、400 mg/kg 投与では S-VCM 群の血漿中濃度は投与後 1 時間以降血中からの消失が緩徐となり、その後 MEEK 群の血漿中濃度を大きく上回り、投与 24 時間後においても血漿中に VCM が検出された。それに対し、MEEK 群における血漿中からの VCM の消失は速やかであり、投与 24 時間後では測定限界以下であった (測定限界 : 2  $\mu\text{g/ml}$ )。

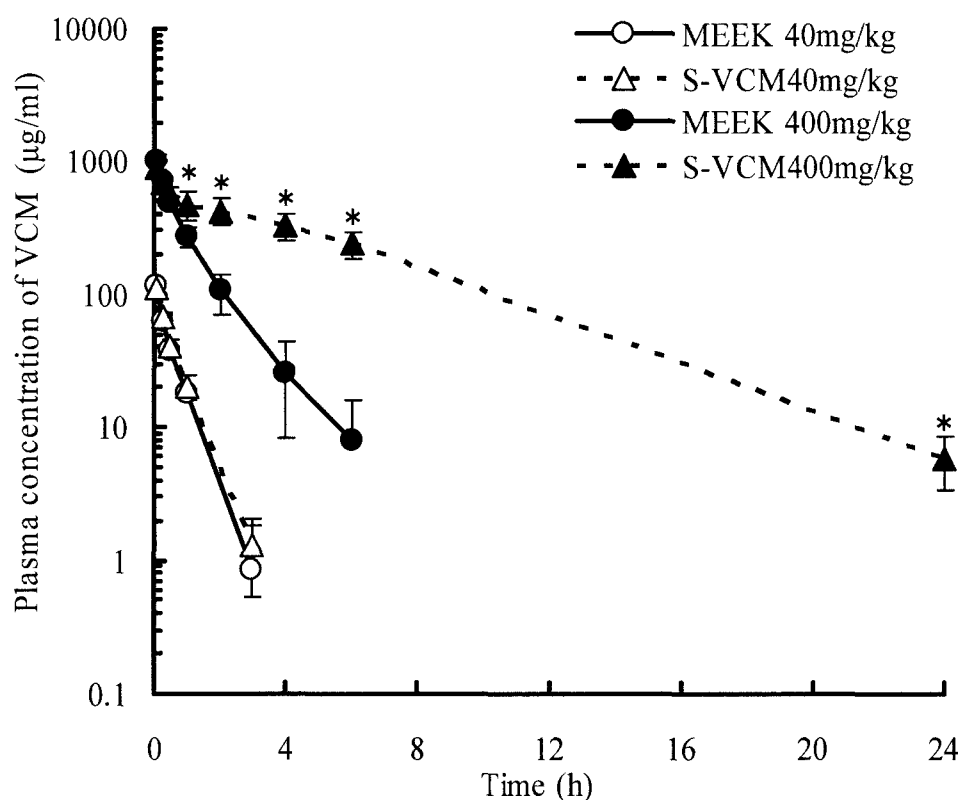


Fig. I -7 Plasma concentration of VCM after intravenous administration of MEEK or S-VCM to rats. (Mean $\pm$ S.D., n= 4)  
\* : P<0.05 MEEK 400 mg/kg vs. S-VCM 400 mg/kg

Table I -3 に両製剤の薬物動態パラメータを示した。40 mg/kg 投与したときの両製剤の半減期( $T_{1/2}$ )は約 0.5 h であり、血漿中濃度-時間曲線下面積( $AUC_{0-\infty}$ )、全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) 及び定常状態分布容積 ( $Vd_{ss}$ ) には、両製剤間において有意差が認められなかった。一方、400 mg/kg 投与したときの MEEK 群及び S-VCM 群の  $T_{1/2}$  はそれぞれ 0.98 及び 3.38 h であり、S-VCM 群では有意に遅延した。 $AUC_{0-\infty}$  はそれぞれ 947 及び 4683  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  で、S-VCM 群の  $AUC_{0-\infty}$  は MEEK 群の約 5 倍であった。 $Vd_{ss}$  に製剤間の有意な差は認められず、 $CL_{tot}$  はそれぞれ 7.29 及び 1.05  $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$  であり、S-VCM 群の  $CL_{tot}$  は MEEK 群の約 1/5 であった。

Fig. I -8 に、MEEK あるいは S-VCM をラットに 40 mg/kg あるいは 400 mg/kg 投与したときの累積尿中排泄率を示した。40 mg/kg 投与したときの MEEK 群及び S-VCM 群の投与後 6 時間の累積尿中排泄率はそれぞれ投与量の 88.1 及び 86.6% であり、有意な差は認められなかった。一方、400 mg/kg 投与群の尿中排泄率は、MEEK 群では投与後 4 時間で投与量の 80% 以上に達したのに対し、S-VCM 群は約 30%、投与後 24 時間の累積尿中排泄率においても 65.9% であり、MEEK 群のそれ (89.4%) より有意に低かった ( $P<0.05$ )。

得られた AUC 及び尿中排泄率から腎クリアランス( $CL_r$ )を算出したところ、MEEK あるいは S-VCM を 40 mg/kg 投与したときの  $CL_r$  はそれぞれ 8.79 及び 7.63  $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$  であり有意差は認められず、腎外クリアランス ( $CL_{nr}$ ) にも差はなかった。また、 $CL_r$  が VCM の遊離型蛋白結合率 ( $f$ )<sup>19)</sup>で補正した糸球体ろ過速度 ( $f\cdot\text{GFR}$ )<sup>20)</sup>を上回っていたことから VCM の腎挙動において尿細管分泌が示唆された。このことは既報<sup>21, 22)</sup>の結果と一致した。一方、400 mg/kg 投与したときの  $CL_r$  はそれぞれ 6.50 及び 1.00  $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$  であり、S-VCM 群において有意に低かった ( $P<0.05$ )。すなわち、MEEK 群の  $CL_r$  は 40 mg/kg 投与したときと顕著な変化はなかったが、S-VCM 群では 40 mg/kg 投与時の 1/8 に減少した。このとき  $CL_{nr}$  には製剤間で有意な差はなかった (Table I -3)。

Fig. I -9 には、MEEK あるいは S-VCM をそれぞれラットに 40 mg/kg あるいは 400 mg/kg 投与したときの累積尿量を示した。40 mg/kg 投与したときの投与

後 6 時間の累積尿量は、両製剤ともに 6～7 ml であり、累積尿量において差は認められなかった。一方、400 mg/kg 投与したときの MEEK 群及び S-VCM 群の投与後 24 時間の累積尿量は 12～15 ml で有意差は認められなかったが、0～6 時間の累積尿量は S-VCM 群の方が有意に少なかった。

Table I -3 Pharmacokinetic parameters of VCM after intravenous administration of MEEK or S-VCM to rats.

Dose		40 mg/kg		400 mg/kg	
		MEEK	S-VCM	MEEK	S-VCM
$T_{1/2}$	(h)	0.49±0.08	0.49±0.06	0.98±0.28	3.38±0.36 *
$AUC_{0-\infty}$	( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	68.0±8.9	76.2±8.8	947±191	4683±1028 *
$CL_{\text{tot}}$	(ml/min/kg)	9.96±1.31	8.83±1.11	7.29±1.44	1.50±0.30 *
$Vd_{ss}$	(ml/kg)	338±30	310±29	438±38	393±74
$CL_r$	(ml/min/kg)	8.79±1.68	7.63±0.72	6.50±1.47	1.00±0.30 *
$CL_{nr}$	(ml/min/kg)	1.17±0.56	1.21±1.42	0.79±0.37	0.50±0.00
$f\cdot GFR^a$	(ml/min/kg)	6.32±0.044	6.30±0.034	—	—

(Mean±S.D., n= 4)

\* : Significant difference from MEEK (400 mg/kg) , (P< 0.05)

a :  $GFR^{20)} = 5.92 \cdot W^{0.77}/W$

(f = 0.78, plasma unbound fraction <sup>19)</sup> W : body weight, kg)

$CL_{nr} = CL_{\text{tot}} - CL_r$

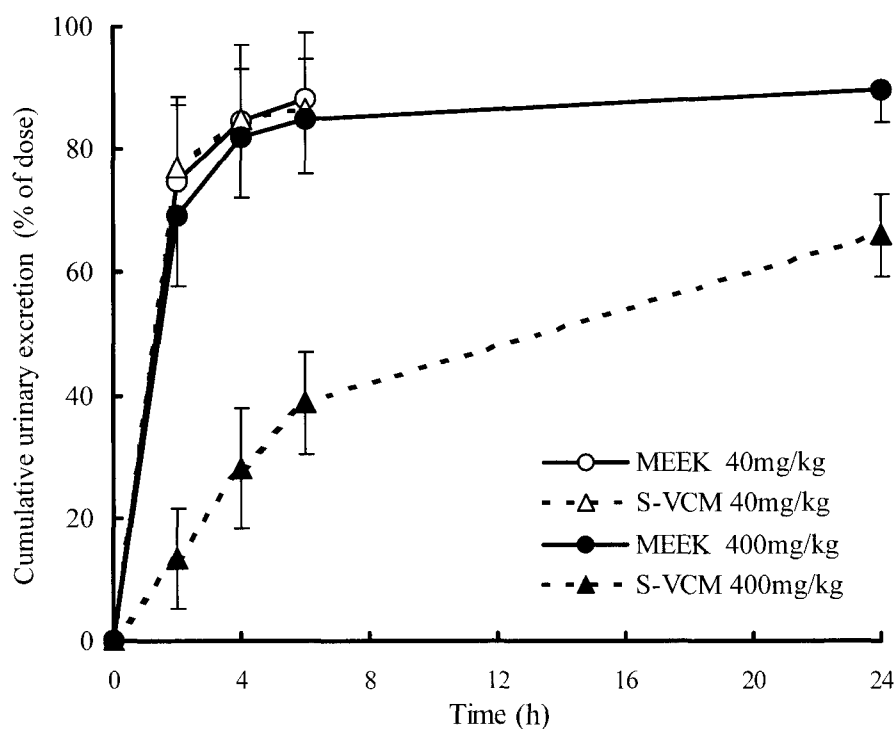


Fig. I -8 Cumulative urinary excretion rate of VCM after intravenous administration of MEEK or S-VCM to rats. (Mean±S.D., n= 4)

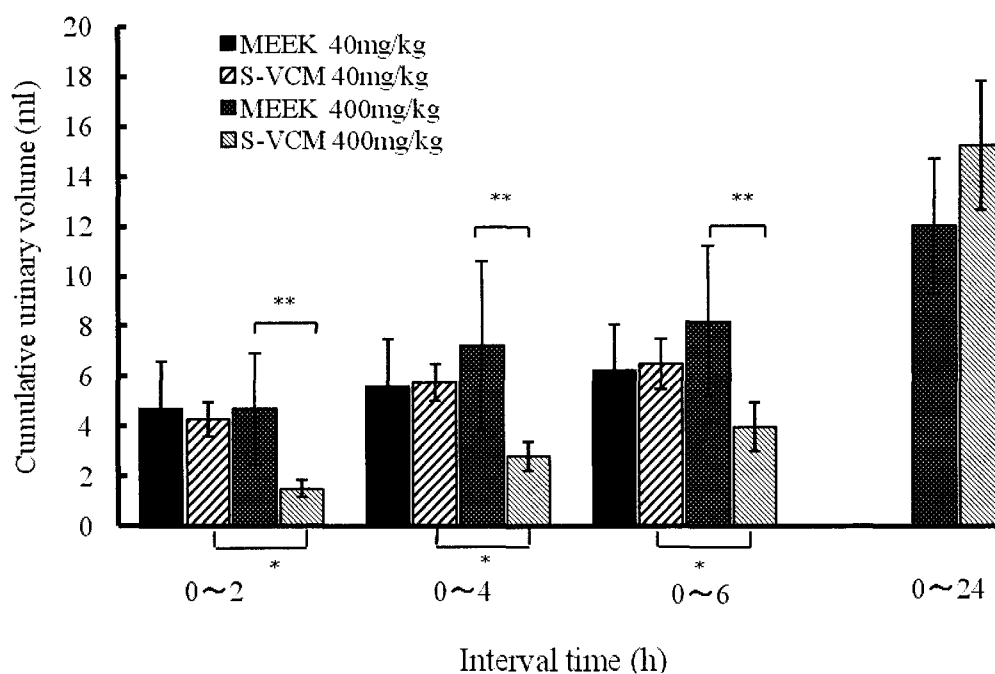


Fig. I -9 Cumulative urine output after intravenous administration of MEEK or S-VCM to rats. (Mean±S.D., n= 4)

\* : P<0.05 S-VCM 40 mg/kg vs. S-VCM 400 mg/kg  
 \*\* : P<0.05 MEEK 400 mg/kg vs. S-VCM 400 mg/kg

また、添加物の効果を確認するため S-VCM あるいは S-VCMPM を投与したときの薬物動態を検討した。その結果を Fig. I-10 及び Table I -4 に示した。S-VCM に添加物を配合した S-VCMPM 群では、S-VCM 群で見られた顕著な  $CL_r$  の低下は見られず、 $CL_r$  の低下は添加物の影響であることが示唆された。なお、このときの S-VCM 群の BUN は高度腎機能障害レベルを示しており、顕著な  $CL_r$  の低下を反映していると考えられた。

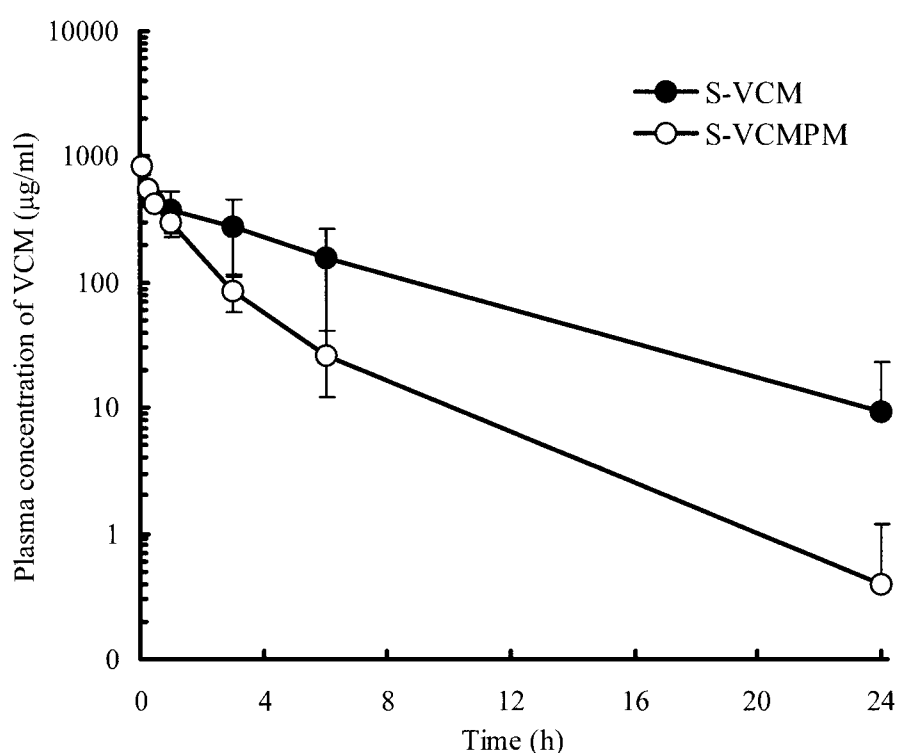


Fig. I -10 Plasma concentration of VCM after intravenous administration of S-VCM or S-VCMPM(400 mg/kg) to rats. (Mean $\pm$ S.D., n= 4)

Table I -4 Pharmacokinetic parameters of VCM and BUN levels after intravenous administration of S-VCM or S-VCMPM (400 mg/kg as VCM) to rats.

		S-VCM	S-VCMPM
$T_{1/2}$	(h)	3.34±1.81	1.86±1.20*
$AUC_{0-\infty}$	( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	3353±2015	1173±298*
$CL_{\text{tot}}$	(ml/min/kg)	3.42±3.53	5.96±1.61*
$Vd_{\text{ss}}$	(ml/kg)	518±108	608±94
$CL_r$	(ml/min/kg)	2.46±2.40	4.25±0.96*
$CL_{\text{nr}}$	(ml/min/kg)	0.96±1.14	1.71±0.76
BUN	(mg/dl)	45.4±24.5	22.4±4.1*

\* : Significant difference from S-VCM (P< 0.05)

(Mean±S.D., n= 4)

#### 第 4 節 考察

MEEK は、添加物として D-マンニトール及びマクロゴール 400 を配合することにより、既存の VCM 製剤の溶解性が大きく改善され、安定性においても優れた凍結乾燥製剤である。医療現場においてはその調製に要する時間の削減をもたらし、使用性に優れた新規配合製剤である。

MEEK の開発にあたり、重篤な副作用の一つである VCM の腎毒性について既存の VCM 製剤 (S-VCM) と比較し、病態生理学的解析を行った。VCM を腎毒性発現用量 (400 mg/kg) ラットに投与したときの腎毒性は、原薬の M-VCM 群及び S-VCM 群では腎機能の指標となる BUN 及び細胞の変性・壊死の指標となる尿中 T-LDH の上昇が認められ、組織学的にも尿細管拡張、尿細管上皮の変性・壊死 (巣状) 及び尿円柱の出現等の腎障害が観察された。これらのことから、VCM の腎障害は糸球体から尿細管に渡って生じていると考えられた。それに対し、添加物を配合した MEEK 群及び S-VCMPM 群では、BUN 及び尿中 T-LDH の上昇が抑制され、組織学的には殆どの個体で明確な変化は認められなかった。これらのことから、添加物の VCM の腎毒性に対する軽減効果が示唆された。

また、このときの薬物動態学的解析を行ったところ、両製剤を VCM として

1 日臨床用量（40 mg/kg）投与した場合はそれぞれの薬物動態及び腎組織への影響にほとんど差はなく、両製剤において同等な有効性が期待できるものと考えられた。実際、健康成人における血漿中濃度推移において同様の推移が得られた<sup>7)</sup>。一方、腎毒性発現用量（400 mg/kg）投与した場合の VCM の薬物動態は、原薬のみの S-VCM 群では  $CL_r$  が臨床用量投与時の約 1/8（1.00 ml/min/kg）に低下し、血漿中濃度の上昇が認められた。VCM の腎排泄には糸球体濾過と尿細管分泌が関与しており<sup>21, 22)</sup>、毒性所見の結果とあわせて考えると糸球体濾過及び尿細管分泌が抑制されている可能性が示唆された。また、投与後 30 分までの血漿中濃度は MEEK 群とほぼ同様に推移し、その後 S-VCM 群の血漿中からの消失の遅延が認められたこと及び投与後 2 時間の尿量、尿中排泄率の減少が認められたことから、S-VCM 群では投与後早期から薬物動態に影響が生じていることが示唆された。これに対し、添加物が配合された MEEK 群では投与後 6 時間までに血漿中 VCM は速やかに減衰し、尿量、尿中排泄率及び  $CL_r$  において臨床用量を投与した場合と比較して顕著な差は認められなかった。

さらに、添加物の効果を確認するため、S-VCM あるいは S-VCMPM を投与したときの薬物動態を検討した。その結果、S-VCM に添加物を配合した S-VCMPM 群では S-VCM 群で見られた顕著な  $CL_r$  の低下は見られず、 $CL_r$  の低下は添加物の影響と示唆された。このときの S-VCM 群の BUN は高度腎機能障害レベルを示しており（Table I -4）、顕著な  $CL_r$  の低下を反映していると考えられた。また、腎毒性試験における BUN のレベル（Fig. I -3）との乖離は、実験系、特にラットのロット差等の違いによると考えられる。これらの毒性所見及び薬物動態の観点から、MEEK に配合された添加物は、VCM の腎毒性を軽減し、腎機能の維持に寄与していることが示唆された。なお、これら VCM の腎毒性に対する添加物の作用メカニズムを検討するにあたり、D-マンニトール及びマクロゴール 400 の腎毒性試験を実施したところ（400 mg/kg 投与）、それぞれ単剤で配合した場合においても 2 種併用時と同程度に腎毒性を軽減した（データ未提示）。本件についてはさらに詳細な検討が必要と考える。

VCM の腎毒性についてはいくつかの報告がある<sup>23-25)</sup>。Nagai ら<sup>24)</sup>はその発生

機序について、VCM が血液中から近位尿細管上皮内に移行し蓄積することが原因で尿細管上皮の再吸収及び分泌機能が阻害され、近位尿細管腔を流れる尿の浸透圧が徐々に高くなり、遠位尿細管で尿円柱が形成されることにより腎毒性が誘発されたと報告している。この様な報告から、MEEK に配合された添加物は VCM の腎臓への蓄積を抑制し、腎機能障害を抑制したものと推察される。

## 第 5 節 小括

MEEK は、添加物として D-マンニトール及びマクロゴール 400 が配合され、既存の S-VCM の溶解性及び安定性が改善された新規配合製剤である。本剤の腎毒性について病態生理学的並びに薬物動態学的解析を行い S-VCM と比較検討した結果、以下の知見が得られた。

MEEK は、正常ラットに VCM として 1 日臨床用量 (40 mg/kg) を投与した場合、その薬物動態及び腎組織への影響において S-VCM と差は無く、S-VCM と同等な有効性が期待できるものと考えられた。一方、VCM として腎毒性発現用量 (400 mg/kg) を投与した場合には、S-VCM では腎機能及び腎組織の障害が認められ、 $CL_r$  の低下により血漿中濃度の上昇が観察されたが、MEEK では腎機能及び腎組織への影響はほとんど認められず、 $CL_r$  の顕著な変化はなかった。これらのことから、MEEK に配合された添加物は VCM の腎毒性を軽減することが示唆された。



## 第Ⅱ章 バンコマイシン誘発腎毒性に対する添加物の影響

第Ⅱ章では、第Ⅰ章で得られた MEEK に配合された添加物の腎毒性軽減効果について検証し、その臨床的意義について考察した。その検証にあたり著者は、腎毒性軽減効果の主な要因が VCM の腎への蓄積抑制であるとするならば、腎機能低下時にはより顕著な効果が確認できるのではないかと仮説をたて、検討を行った。

まず、仮説の検証にあたり動物モデルによる評価系を確立した。すなわち、VCM のヒトにおける排泄パターン（約 90%以上が未変化体として主に糸球体ろ過により尿中に排泄されるが<sup>6)</sup>、尿細管分泌も関与している<sup>26)</sup>）と類似したラットを用いて腎障害モデルを検討した。腎機能障害時の臨床効果や薬物動態を予測するにあたり、種々の腎障害動物モデルの報告があるが、本研究では、最も一般的に知られている塩化第二水銀 ( $\text{HgCl}_2$ ) による薬剤性腎障害モデル及びヒトの腎不全の病態を反映すると報告されている腎の 5/6 を摘出した慢性腎不全モデル、5/6 腎摘出ラット（以下 5/6Nx）を作製し、それらの評価モデルとしての妥当性を病態生理学的な観点から比較した。腎障害モデルはそれぞれに特徴があるが、著者は、本研究の目的には 5/6Nx による評価が適していると判断した。以下にその評価結果及びその臨床的意義について考察する。

### 第 1 節 腎障害モデルの作製及び選択

#### 1. 薬剤性腎障害モデルの作製

薬剤性腎障害モデルとして  $\text{HgCl}_2$  腎障害モデルラットを作製し、その病態生理学的な評価を行った。Table II -1 及び II -2 に正常群及び  $\text{HgCl}_2$  投与後 4 日目の腎障害ラット群の血清及び尿の生化学検査結果を示した。腎障害ラット群の BUN 及びクレアチニン ( $\text{C}_{\text{re}}$ ) の顕著な増大、また、尿中タンパク質、ケトン体及びビリルビンには大きな変化はないが尿中グルコースの上昇及び腎尿路系組織に由来する各尿中酵素、LDH、L-ロイシンアミノペプチダーゼ (L-LAP) 及

び $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) の値に変動が認められた。これらの結果より、 $\text{HgCl}_2$  投与後 4 日目のラットの腎障害誘起が示唆された。

Table II -1 Levels of blood test in rats four days after intravenous  $\text{HgCl}_2$ .

Treatment	Weight (g)	NEFA (meq/l)	GOT (IU/l)	GPT (mg/dl)	TG (mg/dl)	GLU (mg/dl)	BUN (mg/dl)	C <sub>re</sub> (mg/dl)
Control (n=4)	314.2 ±8.9	1.20. ±0.16	130.8 ±18.6	42.8 ±2.9	52.5 ±20.5	153.8 ±30.9	16.4 ±2.7	0.38 ±0.08
$\text{HgCl}_2$ (n=5)	284.9* ±8.9	1.11 ±8.9	126.6 ±8.10	33 ±8.11	57.2 ±8.12	164 ±8.13	145.8* ±8.14	4.79 ±8.15

\*:Significantly different from Control(P<0.05)

NEFA : non-esterified fatty acid

GOT : aspartate aminotransferase

C<sub>re</sub>:creatinine

GPT : alanine aminotransferase

GLU : glutamic acid

TG : triacylglycerol

Table II -2 Urinalysis in rats four days after intravenous  $\text{HgCl}_2$ .

Treatment	UV (g)	pH	Protein (mg/dl)	Glucose (g/dl)	Keton	Bililubin	NAG (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	LAP (IU/l)	GTP (IU/l)
Control (n=4)	19.4 ±9.6	6.5 ~9.0	30 ~300	—	— ~ 1+	— ~ 1+	0.2 ±0.04	0.27 ±0.08	1.87 ±0.95	0.81 ±0.14	11.5 ±2.50
$\text{HgCl}_2$ (n=5)	13.6 ±11.8	5.0 ~9.0	30 ~300	—~0.5	— ~ 2+	— ~ 1+	0.26 ±0.04	0.95* ±0.37	0.99 ±0.71	0.25* ±0.10	3.13* ±1.57

\*:Significantly different from Control(P<0.05)

UV : urinary volume

NAG:N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminase

ALP:alkaline phosphatase

LAP:leucine aminopeptidase

GTP:glutamyl transpeptidase

## 2. 薬剤性腎障害モデルによる薬物動態評価

作製した薬剤性腎障害モデルにおける薬剤の薬物動態について、プロドラッグ型キノロン系合成抗菌剤 NM441 の活性本体である NM394 を用いて正常ラットと比較検討した。NM441 は経口投与後小腸上部から速やかに吸収され、消化管壁、血液及び肝臓で代謝され活性本体 NM394 となる。NM394 は一部代謝を受け、VCM 同様大部分が尿中に未変化体として排泄されることから腎障害時の薬物動態について検討された<sup>27)</sup>。

正常ラット及び腎障害ラットに NM394 を 5 mg/kg 及びイヌリン 100 mg/kg を静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移を Fig. II -1 (NM394) 及び Fig. II -2 (イヌリン) に示し、これら血漿中濃度推移より得られた薬物動態パラメータ及び累積尿中排泄率を Table II -3 に示した。

正常群に比べ腎障害群では NM394 の血漿中濃度は上昇し、 $T_{1/2}$  は約 3 倍に延長、 $AUC_{0-\infty}$  は約 3.5 倍に増大した。 $CL_{tot}$  及び  $CL_r$  はそれぞれ正常群の約 28% 及び約 4% に減少し、累積尿中排泄率は約 14% に減少した。 $Vd_{ss}$  には有意差は認められなかった。イヌリンの血漿中濃度は腎障害群において上昇し、 $T_{1/2}$  は約 6.4 倍に延長、 $AUC_{0-\infty}$  は約 17 倍に増大した。 $CL_{tot}$  は正常群の約 7% に低下し、累積尿中排泄率は約 60% に減少したが ( $P<0.05$ )、 $Vd_{ss}$  に有意差はなかった。GFR は、正常群で 7.48 ml/min/kg、腎障害群で 0.31 ml/min/kg であり、腎障害群の GFR は正常群の約 4% に減少し糸球体の障害が示唆された。また、正常群における  $CL_r$  は 18~19 ml/min/kg であり、遊離型血清蛋白結合率 ( $f=0.52$ 、Table II -4) で補正した値は 35~37 ml/min/kg となり、7.5 ml/min/kg の GFR を上回ることから NM394 の腎排泄には糸球体ろ過のみならず尿細管分泌が存在することが推察された。

以上のことから、NM394 は腎障害による  $CL_r$  の低下により血漿中濃度が上昇し、排泄が遅延することが示唆された。また、イヌリンの薬物動態パラメータから得られた GFR の値より、HgCl<sub>2</sub> 投与後 4 日目のラットの腎障害は糸球体の障害が示唆された。

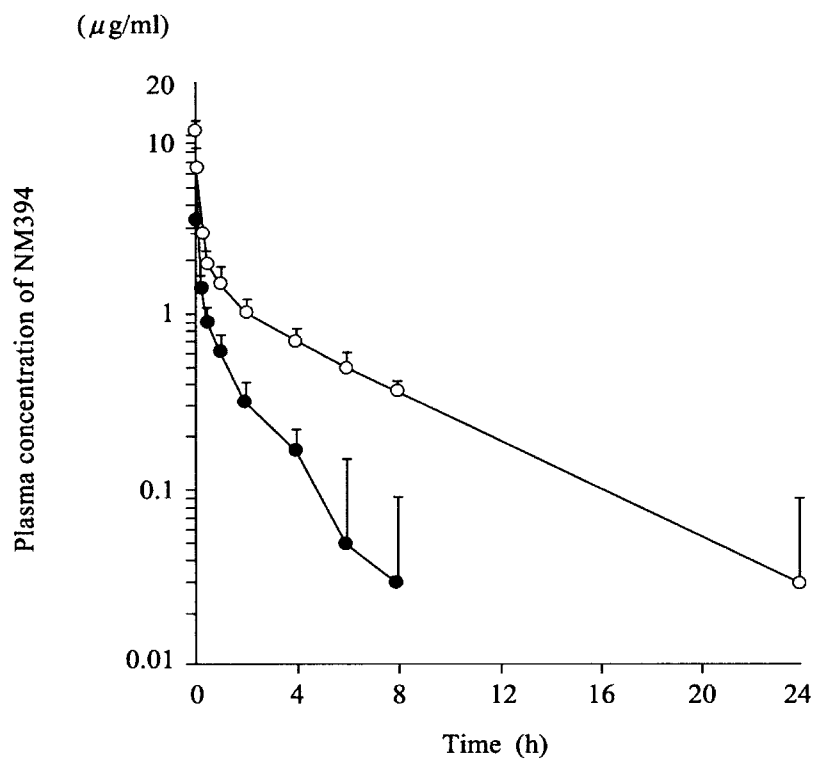


Fig. II -1 Plasma concentration of NM394(5 mg/kg) in control and HgCl<sub>2</sub> rats.  
 ●: control rats (n=4), ○: HgCl<sub>2</sub> treated rats (n=5) (Mean ± S.D.)

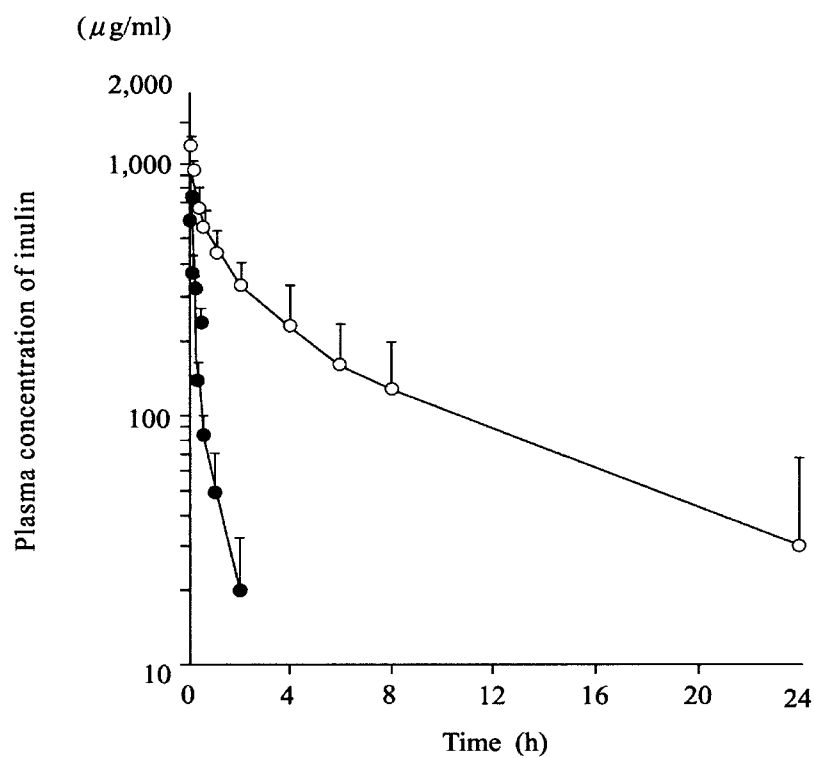


Fig. II -2 Plasma concentration of inulin(100 mg/kg) in control and HgCl<sub>2</sub> rats.  
 ●: control rats (n=4), ○: HgCl<sub>2</sub> treated rats (n=5) (Mean ± S.D.)

Table II -3 Pharmacokinetic parameters and urinary excretion of NM394 (5 mg/kg) and inulin (100 mg/kg) after intravenous administration in control and HgCl<sub>2</sub> treated rats.

PK parameters		NM394		Inulin	
		Control	HgCl <sub>2</sub>	Control	HgCl <sub>2</sub>
Dose	(mg/kg)	5	5	100	100
n		4	5	4	5
T <sub>1/2</sub>	(h)	0.84±0.11	2.51±0.54*	0.59±0.28	3.75±2.36*
AUC <sub>0-∞</sub>	(μg·h/ml)	2.89±0.71	10.17±2.23*	221.5±22.3	3847±1859*
Urinary excretion	(% of dose, 0-24h)	65.1±15.4	9.0±6.5*	98.6±2.8	56.2±26.0*
CL <sub>tot</sub>	(ml/min/kg)	30.07±6.57	8.50±1.73*	7.58±0.75	0.51±0.21*
Vd <sub>ss</sub>	(ml/kg)	211±230	182±150	310±130	160±30
CL <sub>r</sub>	(ml/min/kg)	19.37±5.04	0.82±0.64*	7.48±0.81	0.31±0.18*
CL <sub>nr</sub>	(ml/min/kg)	10.70±5.80	7.68±1.37	—	—
f·CL <sub>r</sub> **	(ml/min/kg)	37.25	1.19	—	—
GFR	(ml/min/kg)	—	—	7.48±0.81	0.31±0.18*

(Mean ± S.D.)

\* : P<0.05 significant difference from control.

\*\* : CL<sub>r</sub> corrected by serum unbound fraction. f are 0.52 in control rats and 0.69 in HgCl<sub>2</sub> treated rats.

Table II -4 Serum protein binding of NM394 in control and HgCl<sub>2</sub> treated rats.

Treatment	Serum concentration (μg/ml)				Mean (%)	
	0.1	1	5	10	bound	unbound
Control	60.8±6.0	53.0±5.9	38.0±0.8	40.8±2.8	48.2	51.8
HgCl <sub>2</sub>	31.7±13.9*	39.5±7.3	28.4±1.6*	25.9±1.4*	31.4	68.6

(Mean ± S.D., n=3~4)

\* : P<0.05 significant difference from control.

### 3. 慢性腎不全モデルラットの作製

腎生理学的に、腎機能の低下はネフロン数の減少と理解される<sup>28)</sup>。そこで、ヒトにおける慢性腎不全の病変進展をよく反映するモデルである 5/6Nx を作製し、模擬処置ラット（シャム）との比較検討を行った。Table II -5 には、腎摘出処置した後 2 週間の飼育を行った 5/6Nx 群とシャム群の腎機能検査の結果を示した。5/6Nx 群では体重減少が見られ、クレアチニークリアランス（C<sub>cr</sub>）はシャム群の約 22% に減少し、BUN は約 3 倍に上昇し有意差が認められた。尿量には有意差が認められなかったが平均値は約 2 倍に増加した。また、腎臓の H-E 染色標本について光学顕微鏡下で観察したところ、病理組織学的に 5/6Nx 群の腎臓はシャム群に比べ、糸球体の肥大及びメサンギウム領域の拡大、尿細管の拡張、間質における炎症性細胞浸潤など、高負荷、疲弊性変化が認められた（Fig. II -3）。

Table II -5 Renal function data in rats.

Renal function		Sham	5/6Nx
n		4	4
Body weight	(g)	299.3±20.2	258.8±26.2
Urine volume	(ml, 0-24h)	16.4±3.5	30.8±12.5
P-C <sub>re</sub>	(mg/dl)	0.31±0.04	0.96±0.09**
U-C <sub>re</sub>	(mg/dl)	88.7±21.1	37.1±18.8*
C <sub>cr</sub>	(ml/min)	3.87±0.98	0.85±0.11**
BUN	(mg/dl)	15.6±2.7	46.2±3.9**

(Mean ± S.D.)

\* : P<0.05 Significant difference from the sham-operated group.

\*\* : P<0.01 Significant difference from the sham-operated group.

P-C<sub>re</sub>: plasma creatinine

U-C<sub>re</sub>: urine creatinine

C<sub>cr</sub> : creatinine clearance

BUN: blood urea nitrogen

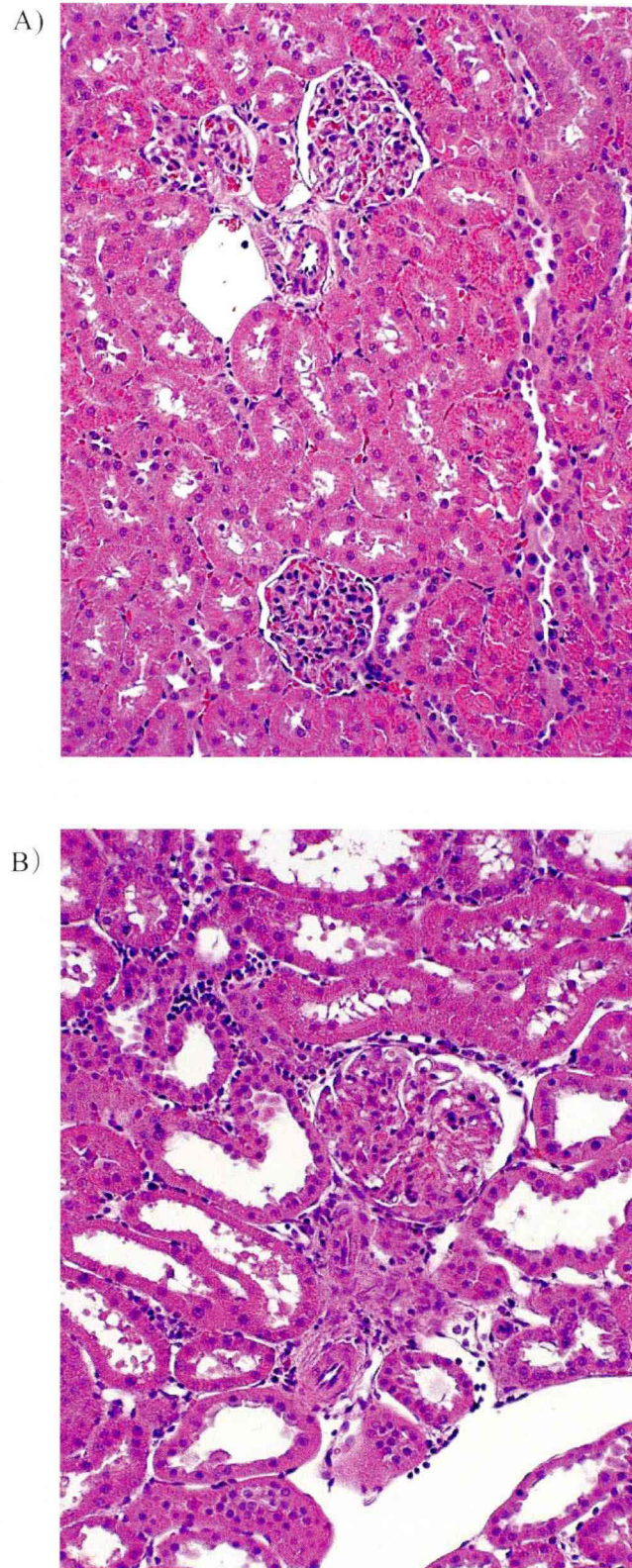


Fig. II -3 Hematoxylin and eosin staining of renal cortex obtained from sham-operated (A) and 5/6Nx rats (B). The magnification for both pathograph is x50.

## 第2節 慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用バンコマイシン 0.5

### 「MEEK」の薬物動態

本研究の評価系として選択した 5/6Nx における MEEK と S-VCM の薬物動態を検討した。

5/6Nx 及び同時期に作製したシャムに MEEK あるいは S-VCM を、VCM として 1 日臨床用量 (40 mg/kg) 投与したときの平均血漿中濃度推移を Fig. II -4 に示し、これら血漿中濃度推移より得られた薬物動態パラメータ及び累積尿中排泄率を Table II -5 に示した。なお、参考データとして、Fig. II -4 には正常ラットにおける平均血漿中濃度推移<sup>9)</sup>を示した。

5/6Nx 及びシャムに MEEK を 40 mg/kg 投与したときの薬物動態を比較したところ、5/6Nx 群の  $T_{1/2}$  はシャム群の約 2.4 倍に延長し、 $AUC_{0-\infty}$  は約 2.6 倍に増大、 $CL_{tot}$  は約 40% に低下した。また、5/6Nx 群の累積尿中排泄率は減少、 $CL_r$  は約 30% に低下した。これらパラメータには有意差が認められたが、 $Vd_{ss}$  及び  $CL_{nr}$  に有意差は認められなかった。

5/6Nx における各製剤の薬物動態を比較したところ、40 mg/kg 投与したときの平均血漿中濃度は S-VCM 群が僅かに MEEK 群の推移を上回っていたが、正常ラットの場合と同様に  $AUC_{0-\infty}$ 、 $CL_{tot}$  及び  $CL_r$  に有意な差は認められなかった。



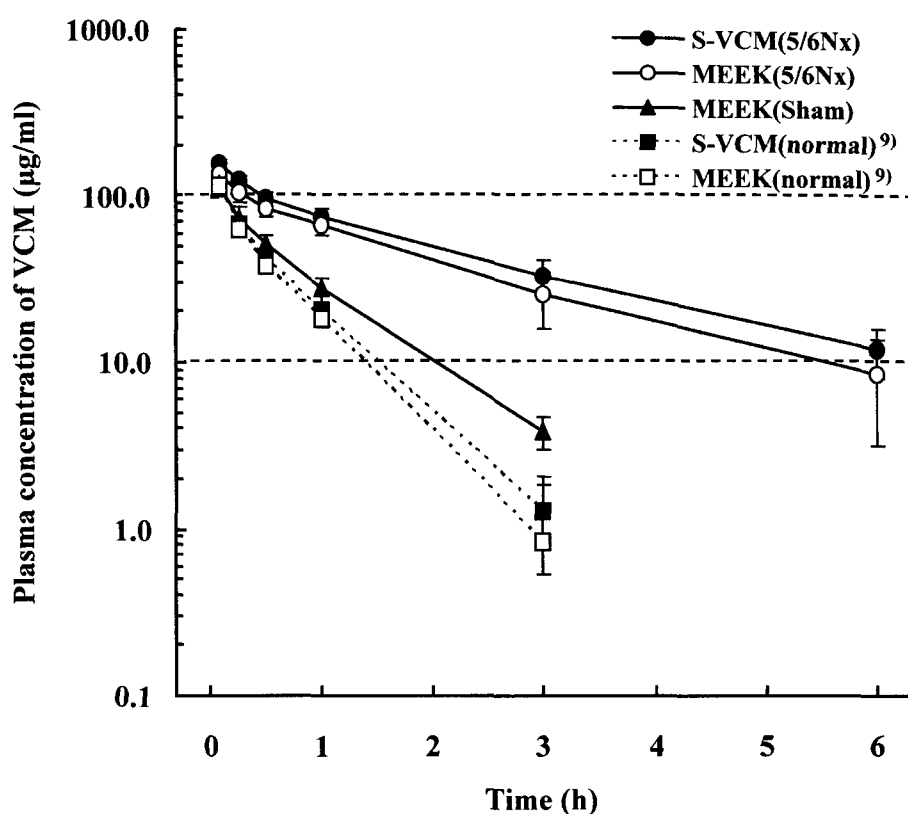


Fig. II -4 Plasma concentration of VCM (40 mg/kg) after intravenous administration of MEEK to sham-operated rats (Sham) or 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx), and S-VCM to 5/6Nx rats. MEEK (open circle, closed triangle) or S-VCM (closed circle) was administered to sham-operated (closed triangle) or 5/6Nx (open circle, closed circle) rats as a dose of 40 mg/kg of VCM (10 ml/kg) at a rate of 2ml/min via tail vein. Blood samples were collected from the left femoral artery at 0.083, 0.25, 0.5, 1, 3 and 6 hour after the injection. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of four rats. For reference, the profiles (open square, closed square) of the plasma concentrations (40 mg/kg) in normal rats.<sup>9)</sup>

Table II -6 Pharmacokinetic parameters and urinary excretion of VCM after intravenous administration of MEEK or S-VCM to sham-operated or 5/6Nx rats.

PK parameters	Sham	5/6Nx	5/6Nx	5/6Nx	5/6Nx
	MEEK	MEEK	S-VCM	MEEK	S-VCM
Dose (mg/kg)	40	40	40	80	80
n	4	4	4	6	5
T <sub>1/2</sub> (h)	0.68±0.08	1.65±0.34**	1.85±0.39	1.58±0.18	2.76±1.06 <sup>#</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> (μg·h/ml)	97±10	255±50**	315±69	485±49	824±255 <sup>#</sup>
Urinary excretion (% of dose, 0-24h)	98.0±4.9	83.9±7.6*	87.1±13.6	86.7±5.8	83.7±9.0
CL <sub>tot</sub> (ml/min/kg)	6.88±0.70	2.67±0.59**	2.17±0.58	2.75±0.29	1.77±0.56 <sup>##</sup>
Vd <sub>ss</sub> (ml/kg)	322.5±43.5	327.5±15.0	300.0±8.2 <sup>†</sup>	328.3±26.4	344.0±50.8
CL <sub>r</sub> (ml/min/kg)	6.75±0.44	2.25±0.73**	1.88±0.44	2.36±0.33	1.47±0.62 <sup>#</sup>
CL <sub>nr</sub> (ml/min/kg)	0.17±0.33	0.42±0.21	0.34±0.30	0.39±0.13	0.30±0.01

(Mean ± S.D.)

\*, \*\*: P<0.05 and P<0.01 significant difference from the sham-operated group (40 mg/kg)

<sup>†</sup> : P<0.05 significant difference from 5/6Nx after the administration of MEEK (40 mg/kg)

<sup>#</sup>, <sup>##</sup>: P<0.05 and P<0.01 significant difference from 5/6Nx after the administration of MEEK (80 mg/kg)

次に、5/6Nx に MEEK あるいは S-VCM を VCM として 1 日臨床用量の上限である 2 倍量の 80 mg/kg を投与したときの薬物動態について検討した。平均血漿中濃度推移を Fig. II -5 に示し、これら血漿中濃度推移より得られた薬物動態パラメータ及び累積尿中排泄率を Table II -6 に示した。

各製剤を 80 mg/kg 投与したときの平均血漿中濃度は、S-VCM 群では MEEK 群より高く推移し、MEEK 群に比べ T<sub>1/2</sub> が約 2 倍に延長、AUC<sub>0-∞</sub> は約 2 倍に増大、CL<sub>tot</sub> 及び CL<sub>r</sub> はそれぞれ約 60% に低下した。5/6Nx における CL<sub>tot</sub>、CL<sub>r</sub>、CL<sub>nr</sub>、Vd<sub>ss</sub> 及び尿中排泄率について、薬剤 (MEEK vs. S-VCM) 及び投与量 (40 mg/kg vs. 80 mg/kg) を要因とする二元配置分散分析による解析を行った。いずれにおいても薬剤及び投与量の二要因の間に交互作用は検出されなかった (P>0.15)。薬物動態パラメータに投与量の違いによる差は認められなかったが、CL<sub>tot</sub> 及び CL<sub>r</sub> において MEEK 群と S-VCM 群で薬剤の違いによる差が認められ

た ( $CL_{tot}$  ;  $P=0.0040$ 、 $CL_r$  ;  $P=0.0144$ )。

さらに、両製剤の血漿中濃度推移に差が認められたことから、各製剤 80 mg/kg 投与 24 時間後の腎臓中濃度を測定したところ、S-VCM 群の腎臓中濃度 ( $653.8 \pm 186.0 \mu\text{g/g}$ ) は MEEK 群 ( $442.9 \pm 120.6 \mu\text{g/g}$ ) の約 1.5 倍であった ( $P=0.0490$ 、Fig. II -6)。このとき、血漿中濃度はいずれも測定限界 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) 以下であった。

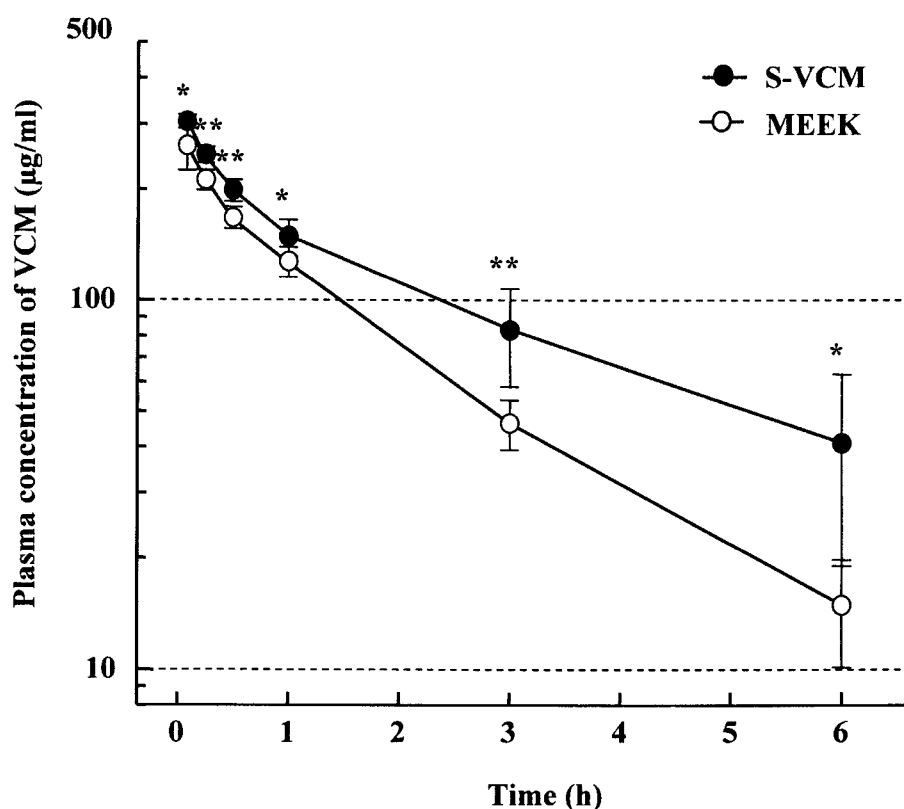
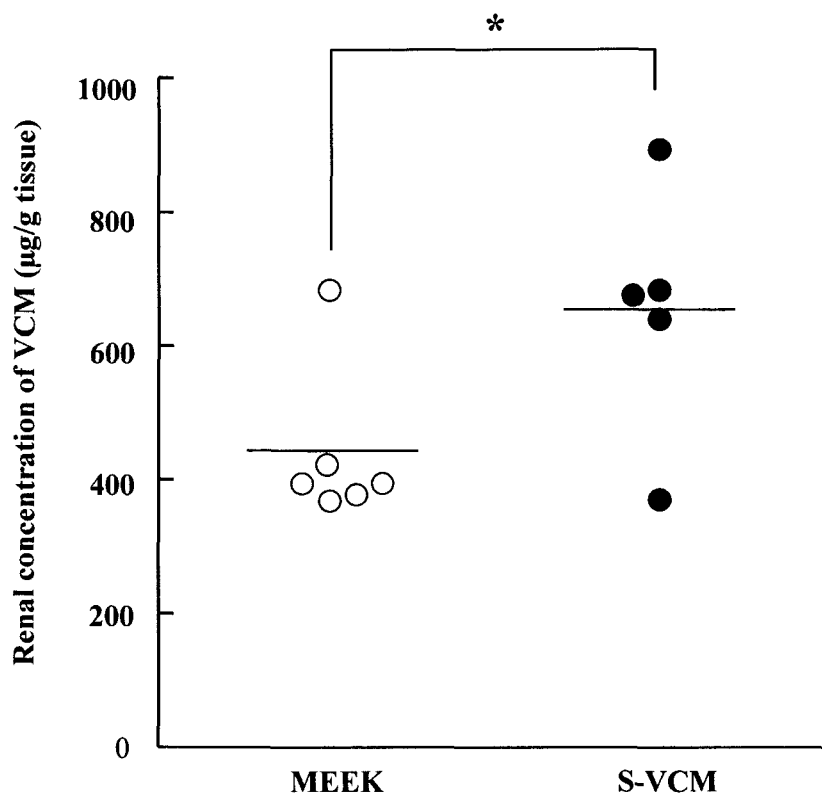


Fig. II -5 Plasma concentration of VCM (80 mg/kg) after intravenous administration of MEEK or S-VCM to 5/6Nx rats. MEEK (open circle) or S-VCM (closed circle) was administered to 5/6Nx rats as a dose of 80 mg/kg of VCM (10 ml/kg) at a rate of 2 ml/min via tail vein. Blood samples were collected from the left femoral artery at 0.083, 0.25, 0.5, 1, 3 and 6 hour after the injection. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of six rats for MEEK treated group and five rats for S-VCM treated group, respectively. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from MEEK treated rats.



\* : P=0.0490

Fig. II -6 Renal tissue concentration of VCM after intravenous administration of MEEK or S-VCM as a dose of 80 mg/kg of VCM to 5/6Nx rats. Twenty-four hours after the intravenous administration of MEEK or S-VCM as a dose of 80 mg/kg of VCM via tail vein, the kidneys were collected for the measurement of renal tissue concentration of VCM. Open and closed circles indicate the concentrations of VCM in the remnant kidneys after the administration of MEEK or S-VCM. \*P<0.05, significantly different from MEEK-treated group.

### 第3節 慢性腎不全モデルラットにおけるバンコマイシン誘発腎毒性の病態生理学的解析

5/6Nx に MEEK あるいは S-VCM を VCM として 1 日臨床用量の 2 倍量の 80 mg/kg を投与したときの、薬物動態及び腎臓中濃度に差が認められた。そこで、このときの腎組織及び腎機能の病態生理学的解析を行った。

腎臓の病理検査の結果は、わずかではあるが S-VCM 群では糸球体の肥大及びメサンギウム領域の拡大、尿細管の拡張傾向が見られたが、両薬剤間に顕著な違いは認められなかった (Fig. II -7)。また、薬剤投与前後の BUN 及び  $C_{cr}$  の値から腎機能の変化を検討したところ有意な差は認められなかった (Table II -7)。

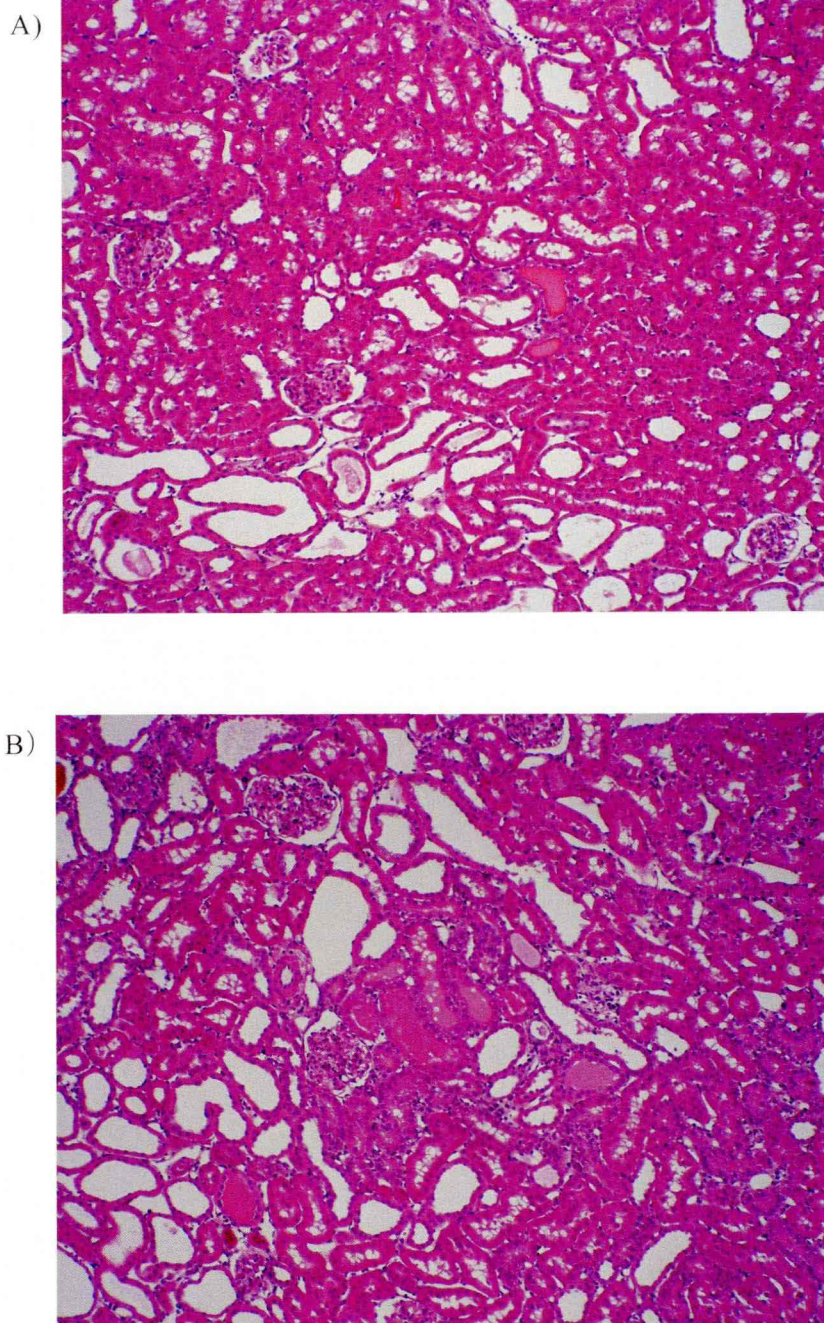


Fig. II -7 Hematoxylin and eosin staining of renal cortex obtained from 5/6Nx rats at 24 hours after the intravenous administration of MEEK(A) or S-VCM(B) as a dose of 80 mg/kg of VCM. The magnification for both pathograph is x25.

Table II -7 Creatinine clearance and BUN before and after intravenous administration of MEEK or S-VCM to 5/6Nx rats.

Dose (mg/kg)	Formulation	n	C <sub>cr</sub> (ml/min)		BUN (mg/dl)	
			before	after	before	after
40	MEEK	4	0.78±0.65	0.97±0.36	45.3±9.8	49.8±14.3
	S-VCM	4	0.74±0.33	0.98±0.21	45.5±10.4	57.2±16.1
80	MEEK	6	1.20±0.33	1.20±0.36	48.7±18.8	42.6±18.5
	S-VCM	5	0.84±0.37	0.71±0.26	65.6±23.7	73.4±33.3

(Mean ± S.D.)

C<sub>cr</sub> : creatinine clearance

BUN: blood urea nitrogen

## 第4節 考察

### 1. 腎障害モデルの作製及び選択

第I章で得られたMEEKに配合された添加物の腎毒性軽減効果を検証するにあたり、腎毒性軽減効果の主な要因がVCMの腎への蓄積抑制であるとするならば、腎機能低下時にはより顕著な効果が確認できるのではないかと仮説をたて、その評価系としての腎障害モデルを選択した。

まず、最も一般的に知られているHgCl<sub>2</sub>腎障害モデルを作製し、その生化学的所見を確認した。血清及び尿の生化学検査結果より、腎障害時に見られる現象として、血清中BUN及びC<sub>re</sub>の上昇、腎尿路系組織に由来する各尿中酵素の変動及び尿中グルコースの上昇、そしてインスリンの薬物動態パラメータの結果からGFRの低下が認められ、近位尿細管及び糸球体の障害が示唆された。すなわち、HgCl<sub>2</sub>腎障害モデルでは、糸球体及び近位尿細管に及ぶ広範囲に渡って障害を起こしているものと考えられた。本モデルの腎障害発症メカニズムは、糸球体基底膜の異常による腎血液循環の異常である。また、Hgの尿細管細胞の酵素のSH基への結合に基づく直接的作用によると報告されている<sup>29)</sup>。本モデルを用い、腎排泄型キノロン系合成抗菌剤NM441の活性本体NM394の腎障害

時の薬物動態を検討したところ、腎障害による  $CL_r$  の低下により、NM394 の血漿中濃度が上昇し、排泄が遅延することが確認できた。

次に、腎生理学的に腎機能の低下はネフロン数の減少と理解されることから<sup>28)</sup>、腎不全モデルとして汎用されている高度腎摘出動物の 5/6Nx を作製し、その腎機能についてシャムと比較検討を行った。作製した 5/6Nx（腎摘出後 2 週間）の腎機能は、 $C_{cr}$  の低下及び BUN の上昇が認められ、腎の病理組織学的所見では、糸球体の肥大及びメサンギウム領域の拡大、尿細管の拡張、間質における炎症性細胞浸潤など、高負荷、疲弊性変化が認められた。これらにより 5/6 腎摘出による組織学的・機能的腎不全の進行が確認された (Fig. II -3)。なお、5/6Nx の腎機能は、健康成人の  $C_{cr}$  を 70 ml/min 以上<sup>30)</sup>としてシャム群と 5/6Nx 群の  $C_{cr}$  の比から類推すると、高度腎機能障害程度 ( $C_{cr}$ : 30 ml/min 以下) と考えられた。

本モデルの歴史的背景は、1932 年に Chanutin ら<sup>31)</sup> が約 3/4 の腎摘出ラットにおいて、進行性の高窒素血症、高血圧、蛋白尿の出現と残存腎に顕著な糸球体硬化が認められることを明らかにし、1975 年に Shimamura ら<sup>32)</sup> は、5/6Nx を用いた形態学的検討により、5/6Nx の残存糸球体にまず代償性肥大が起り、時間が経つにつれ糸球体硬化が出現することを明らかにした。以来現在まで 5/6Nx は主に糸球体硬化を来し慢性腎不全に至るモデルとして、種々の病態生理学的研究のみならず、化学療法をはじめ腎機能低下時における各種薬物動態の研究にも応用されている<sup>33-36)</sup>。本モデルの残存糸球体は、もともと正常な糸球体であるため動物間のばらつきが少ないモデルであり、長期間の飼育により、非炎症性の慢性腎不全モデルとして成立される<sup>37-39)</sup>。その腎障害発症の進展には、ネフロン数の減少により残存ネフロンへの負荷が増大し、糸球体内の静水圧が上昇する。それにより、内皮細胞に機械的損傷が起り、引き続く一連の現象により糸球体障害が発症し進展するという報告がある。また、形態学的な位置関係から、糸球体肥大が起るとメサンギウム細胞の増殖と肥大及びメサンギウム基質の蓄積がおこり、糸球体硬化が発症するという報告がある。そして、本モデルの形態学的変化は巣状硬化性病変に類似し、高血圧や高



室素血症、貧血の進行など病態的にヒトの腎不全に類似していると報告されている<sup>39)</sup>。

著者は、各腎障害モデルの特徴を確認後、本研究の薬剤評価に妥当なモデルを選択した。すなわち、薬剤性腎障害ラットでは、その発現メカニズムにおいて、投与した薬剤と組織中酵素との相互作用及び、血液循環への影響や糸球体の異常が伴うことに対し、5/6Nx では評価薬剤以外の薬剤の影響がなく、その残存腎はもともと正常腎であり、ヒトの慢性腎不全の病変進展をよく反映しているモデルであること、また、本研究の目的が2種の薬剤投与後の病態生理学的及び薬物動態学的な比較検討であり、詳細な情報を得る必要があることから、5/6Nx を本研究の評価系に選択した。

5/6Nx は、病態時における腎局在性トランスポーターの発現変動の研究に用いられており、分子・細胞レベルでの薬物動態制御機構に関する様々な知見が蓄積されつつある<sup>40, 41)</sup>。最近の報告では、2週間飼育 5/6Nx において、腎の有機カチオントランスポーターOCT1、有機アニオントランスポーターOAT1 及び OAT3、ペプチドトランスポーターPEPT1 は尿細管薬物トランスポーターとして維持されていること<sup>37, 42-44)</sup>。また、新規プロトン交換輸送型有機カチオントランスポーターrMATE1 (multidrug and toxin extrusion) 及び  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送系 NHE3 は 5/6Nx において減少していることが示された<sup>45)</sup>。今後の本研究の進展のためにも妥当なモデルと考えられた。

## 2. 慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態及び病態生理学的解析

既に正常ラットに1日臨床用量 (40 mg/kg) を投与したとき両薬剤間に薬物動態及び腎機能に差がないことを確認したことから<sup>9)</sup>、作製した 5/6Nx の薬物動態について MEEK を用いてシャムと比較した。5/6Nx 群は、シャム群に比べ  $C_{cr}$  の低下に依存して  $CL_r$  が低下し、血漿中濃度の上昇、血漿中からの消失遅延が見られた。これは、 $C_{cr}$  と消失速度定数が高い相関関係を持つ VCM の体内動態を反映していると考えられた<sup>46)</sup>。また、投与後 24 時間の累積尿中排泄率の

減少が認められたが、これは  $CL_r$  の低下に伴う VCM の排泄の遅延と考えられた。このとき、参考として示した正常ラット群とシャム群の平均血中濃度推移に差が見られたが、これは、偽手術とその状況での 2 週間の飼育の影響があると考えられた。この差にはラットの週齢及びロットの違いも含まれると考えられるが、5/6Nx 群との差には及ばない。

次に、5/6Nx において両製剤の薬物動態を比較したところ、1 日臨床用量 (40 mg/kg) では差は見られなかったが 80 mg/kg 投与では薬物動態に差が見られ、S-VCM 群の腎臓中濃度は MEEK 群の 1.5 倍高かった。このとき、両薬剤投与後の病理検査の結果及び薬剤投与前後の腎機能の変化からは、腎機能障害の増悪の差を検出することは難しかった (Fig. II -7、Table II -7)。すなわち、5/6Nx を用いることにより、VCM の腎毒性が発現する暴露量には及ばない適応臨床用量の範囲で、両薬剤の薬物動態学的な差を検出でき、添加物が VCM の腎内分布、排泄過程になんらかの影響を及ぼしたと考えられた。本モデルを用いて、両製剤間の病態生理学的な差を示すには数日間の反復投与も考えられるが、その差が本モデルの病態の進行によるものか薬剤によるものか、さらに判断が難しくなると推察され、本モデルにおける検討の限界と考えられた。また、今回の実験における各群の n 数は、同ロットのラットを用い同時系列で 2 群間比較を行うため、技術的に処理数が限られたことから、統計処理可能な最小限となった。

著者は、MEEK の添加物の腎毒性軽減の主な要因が、VCM の腎への蓄積抑制であるとするならば、その軽減効果は腎機能低下時には顕著に表れるという仮説を立てた。それに対し、5/6Nx での評価により、VCM の 1 日臨床用量の上限である 2 倍量においてその軽減効果を検出でき、仮説の検証に繋げることができたと考える。すなわち、MEEK は VCM 誘発腎毒性の軽減効果を有し、薬剤性腎毒性の増悪を防止すると推察され、これは腎機能低下患者における VCM の安全性改善が期待できるものであり、その臨床的意義は大きいと考える。

VCM の腎毒性については、培養上皮細胞 (LLC-PK<sub>1</sub> 細胞) を用いた毒性評価<sup>47)</sup>、イオン型薬物を用いた腎排泄機構の検討<sup>21, 48)</sup>、ホスホマイシンやイミペネム/シラスタチンの VCM の腎毒性に対する腎保護作用や VCM の腎細胞へ

の取り込み抑制作用について報告されている<sup>49-51)</sup>。しかし、未だその機序については十分に解明されておらず、VCMの血液から尿細管上皮細胞への移行を調整する膜トランスポーターは見つかっていない。MEEKの添加物によるVCMの腎毒性軽減効果についても現段階では明らかではないが、MEEKの添加物の腎毒性軽減の主な要因がVCMの腎への蓄積抑制であると仮定するならば、現時点で推察される要因としてはD-マンニトールの細胞保護作用<sup>52、53)</sup>及び腎血流量及び糸球体ろ過速度の上昇により、VCMの腎への分布を変化させる可能性<sup>54、55)</sup>、などが考えられた。

近年、VCMのTDMによる投与設計においてその有効性、毒性、血中濃度について論じられ、ピーク値とトラフ値の妥当性について議論された。VCMの効果をより高い確率で望むためには、副作用の出現を考慮しつつAUCを高くする投与設計が必要となり、安全性、特にトラフ値に配慮しながら1日投与量を増加させる必要がある<sup>56)</sup>。また、Bayesian法による投与期間中の予測精度の悪化因子の一つとしてVCMのクリアランスの経時的な減少が示唆されている<sup>57)</sup>。これらの知見や今回の結果は、VCMのCL<sub>r</sub>の遅延は腎に薬物自身が蓄積することによって引き起こされていることを示唆する。すなわち、VCMが引き起こす腎毒性は、ホスホマイシンやイミペネムのようなVCMの腎への分布を抑制する他の薬剤を使用すること、あるいはMEEKのような薬物の腎への蓄積を低下させる添加物を含む新製剤によって防ぐことができる可能性も示唆される。

## 第5節 小括

MEEK に配合された添加物の腎毒性軽減効果について検証し、その臨床的意義について考察した。著者は、腎毒性軽減効果の主な要因が VCM の腎への蓄積抑制であるとするならば、腎機能低下時にはより顕著な効果が確認できるのではないかと仮説をたて、腎障害モデルとして 5/6Nx を選択し、本研究を進めた。

5/6Nx を用いることにより、VCM の病理組織学的な腎毒性が発現する暴露量には及ばない適応臨床用量の範囲で、添加物が VCM の腎内分布、排泄過程になんらかの影響を及ぼしていることを確認できた。すなわち、MEEK は VCM 誘発腎毒性の軽減効果を有し、薬剤性腎毒性の増悪を防止すると推察され、この結果から腎機能低下患者における VCM の安全性が期待でき、その臨床的意義は大きいと考える。

## 総 括

著者は、VCM の新規配合製剤の開発に関わり、その製剤の VCM 誘発腎毒性の軽減効果について病態生理学的及び薬物動態学的な解析を行い、以下の成果を得た。

VCM 新規配合製剤である MEEK は、500 mg の VCM に対し D-マンニトール及びマクロゴール 400 をそれぞれ 100 mg ずつ配合した凍結乾燥製剤であり、VCM の溶解過程においてゲルを形成しやすいという物理化学的特性<sup>5, 6)</sup>を克服し、溶解性及び安定性が改善された製剤である。医療現場においてはその調製に要する時間の削減となり、使用性の向上を図ることができた。

著者は、この VCM の新規配合製剤の開発過程において安全性について検討したところ、MEEK に配合された添加物 D-マンニトール及びマクロゴール 400 が、VCM の腎毒性を軽減する効果があることを見出した<sup>9)</sup>。すなわち、正常ラットに MEEK の 1 日臨床用量 (40 mg/kg) あるいは腎毒性発現用量 (400 mg/kg) を投与した場合の安全性及び薬物動態について、添加物が配合されていない VCM の先発医薬品 (S-VCM) と比較したところ、1 日臨床用量では、両製剤の安全性及び薬物動態に違いは認められなかったが、腎毒性発現用量においては VCM の腎機能と腎組織への影響及び薬物動態に差が認められ、MEEK に配合された添加物は、VCM の腎毒性を軽減することが確認された<sup>9, 10)</sup>。

次に、この添加物の腎毒性軽減効果を検証し、その臨床的意義について検討した。著者は、この腎毒性軽減効果の主な要因が、VCM の腎への蓄積抑制であるとするならば、腎機能低下時にはより顕著な効果を検証できるのではないかと仮説を立て研究を進めた。まず、腎機能低下状態を想定した腎機能障害モデルの評価系を確立し、慢性腎不全モデルである 5/6Nx の評価系としての妥当性を確認した。その 5/6Nx を用いて各製剤を比較検討した結果、VCM の 1 日臨床用量の上限である 2 倍量においてその軽減効果を検出でき、仮説の検証に繋がるものと考えられた。すなわち、MEEK は VCM 誘発腎毒性の軽減効果を有し、薬剤性腎毒性の増悪を防止すると推察され、これは腎機能低下患者における VCM の安全性改善につながるものであり、その臨床的意義は大きいと考えられた。

薬剤性臓器障害の三大障害（骨髄障害、肝障害、腎障害）の一つである腎障害は、医薬品の適正使用において非常に重要な課題である。本研究により、抗MRSA薬の代表的薬剤であるVCM製剤において、VCMの腎毒性軽減効果の知見が得られたことは、臨床において非常に大きな意義のあることと考える。

本研究において動物実験によりいくつかの知見を得ることができた。しかし、実際の多様な臨床症状を類推するには限界がある。現在、医療機関においてMEEKの臨床における評価の情報が蓄積されつつあるが、今後さらにプロスペクティブな治験の実施等が望まれる。また、これら添加物の腎毒性軽減効果のメカニズムについては、VCM自身の腎毒性機序に関する明確な報告がないことから未だ解明に至っていない。臨床データの蓄積とともに、さらなる病態生理学的及び薬物動態学的な研究により、分子・細胞レベルにおける薬物動態制御機構の関与について等の情報が得られることが期待される。

## 謝 辞

本研究に際して終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院・薬剤部長 乾 賢一教授及び同病院薬剤部 増田智先講師に謹んで深甚なる謝意を表します。

また、本論文の集成にあたり、多大な御指導と並々ならぬ御高配を戴きました星薬科大学医療薬剤学教室 町田良治教授並びに明治製菓㈱・医薬総合研究所（旧薬品総合研究所）・薬剤研究所長、現在ジェネリック開発部 吉光寺敏泰部長に深く感謝いたします。

更に、有益な御助言を戴くと共に、動物による評価試験に際して多大なご協力を戴きました明治製菓㈱・医薬総合研究所・動態安全性研究所（旧薬物動態研究所） 黒澤 徹所長及び同研究所・薬物動態研究室 芝崎茂樹室長に深く謝意を表します。また、実験の一部にご協力戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部の院生の方々並びに明治製菓㈱医薬総合研究所の研究室員の方々に御礼申し上げます。

最後に、本研究の機会を与えて戴き、御鞭撻を賜ると共に、種々の御便宜を御計りくださいました明治製菓㈱取締役・医薬総合研究所 真壁 理所長、薬理研究所 神藤康弘所長（元動態安全性研究所長）並びに薬品名古屋支店 中村 洋支店長（元学術部長）に心から感謝の意を表します。

## 実験の部

### 第 I 章実験の部

#### I - 1. マクロゴール 400 による VCM のヒスタミン遊離抑制作用

##### 1. 被験物質及び試薬

マクロゴール 400（丸石製薬㈱）及び塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5g（塩野義製薬㈱、以下 S-VCM）は市販のものを使用した。

##### 2. ラット腹腔肥満細胞の採取

SD 系雄性ラット（SPF、日本エスエルシー㈱）を放血致死後、腹腔内に氷冷したリン酸緩衝生理食塩液（PBS）(-)液を 15 ml 注入し 1 分間マッサージする。開腹して腹腔液を回収し、5℃、200G で 10 分間遠沈し、ペレット状の肥満細胞を採取した。

##### 3. 肥満細胞液の調製<sup>58)</sup>

氷冷下 PBS(+)液 900  $\mu$ l に、肥満細胞を各  $5 \times 10^5$  個含まれるように加え、バッファー中に予めマクロゴール 400 を添加し（0、0.1、0.5、1、3、5、10、15%）、遊離刺激時に設定した含有率になるように調製した。

##### 4. ヒスタミン遊離試験

調製した肥満細胞液（900  $\mu$ l）を 37℃の恒温槽で 5 分間加温後、調製した VCM（20 または 30 mM）を 100  $\mu$ l 加え 10 分間インキュベーションする。その後、氷冷により遊離反応を停止させた。肥満細胞液は遠沈（200G、5℃、10 分間）して上清を分離し、ヒスタミン濃度を測定するまで -80℃で凍結保存した。ヒスタミン濃度測定は、採取した上清を PBS(+)液で希釈し、ELISA（MBL㈱、ヒスタミン ELISA キット「イムノテック」）により測定した。



## I-2. 点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬物動態

### 1. 被験物質及び試薬

点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」（明治製菓㈱、以下 MEEK）及び塩酸バンコマイシン点滴静注用 0.5 g（塩野義製薬㈱、以下 S-VCM）は市販の製剤を使用した。MEEK の原薬（以下 M-VCM）は ALPHARMA より購入した。また、S-VCM に D-マンニトール（東和化成㈱）及びマクロゴール 400（丸石製薬㈱）を MEEK と同一配合率となるように添加した混合物（以下 S-VCMPM）を調製した。

### 2. 実験動物

6週齢のSD系雄性ラット（日本チャールスリバー㈱）を約1週間の馴化期間の後7週齢で使用した。馴化中は自由摂食・摂水で飼育し、飼料には実験動物用固形飼料（オリエンタル酵母工業㈱）を与えた。実験は“Principles of Laboratory Animal Care”（NIH publication #85-23,1985）及び「動物実験管理に関する指針（明治製菓㈱ 医薬開発部門）」に則って実施した。

### 3. 投与液の調製

各被験物質に局方生理食塩液（大塚製薬工業㈱、以下生食）を加えて用時溶解し、4 及び 40 mg/ml の投与液を調製した。

### 4. 腎毒性試験

#### 4-1. 薬剤投与

ラットに MEEK、M-VCM、S-VCM あるいは S-VCMPM をそれぞれ VCM として 400 mg/kg 静脈内投与した。すなわち、4 あるいは 40 mg/ml の各投与液を容量として 10 ml/kg を 2 ml/分の速度で投与した。なお、コントロール群には生食を投与した。

#### 4-2. 生化学検査及び尿検査

薬剤投与 24 時間後の血漿について BUN を測定した。また、投与後 24 時間

の蓄尿試料の LDH 及び NAG を測定し、T-LDH 及び T-NAG を求めた。BUN 及び  $C_{re}$  は、Urease・BCG 法 (AUTO-5、富士メディカル(株)製) 及び Creatininase F-DAOS 法 (COBAS MIRA plus、Roche 社製) で測定した。なお、血漿及び尿試料は適宜精製水で希釈した。

#### 4-3. 病理検査

採血終了後、直ちに腋窩動静脈切断により放血致死させ、主に腹腔内諸臓器・器官を肉眼的に観察し、腎臓を摘出した。摘出した腎の重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従い H-E 染色標本を作製した。その組織標本を光学顕微鏡下で観察した。

### 5. 薬物動態試験

#### 5-1. 薬剤投与及び生体試料の採取

ラットの体重を測定後、エーテル麻酔下で大腿動脈にポリエチレンチューブ (BECTONDICKINSON CO., Ltd. PE50) を挿入し、外尿道部にシリンジを装着した後ボールマンケージに固定した。ラットが覚醒後、薬剤を尾静脈から 40 mg/kg あるいは 400 mg/kg 単回投与した。薬剤投与後経時的に採血し、血液を低温下遠心分離し血漿を分取した。また、各群において自然排泄尿を採取し、比重を 1 として重量から尿量を求めた。血漿及び尿試料は、薬物濃度測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存した。

#### 5-2. 薬物濃度測定

血漿中及び尿中 VCM 濃度の測定は試験菌に *Bacillus subtilis* ATCC6633 を用い、標準曲線法による bioassay 法で行った。本定量法における定量限界は、血漿試料 0.75  $\mu\text{g/ml}$ 、尿試料 15  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 5-3. 薬物動態解析

血漿中 VCM の濃度推移につき WinNonlin (Scientific Consulting, Inc.) を用いてモデル非依存的に解析を行い、 $AUC_{0-obs}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $T_{1/2}$ 、 $CL_{tot}$  及び  $Vd_{ss}$  を求めた。 $CL_r$  及び  $CL_{nr}$  を下式により算出し、非結合型腎外クリアランス ( $CL_r/f$ ) は、 $CL_r$  を遊離型蛋白結合率 ( $f=0.78$ )<sup>19)</sup> で除した。なお、 $CL_r$  は、

40 mg/kg 投与では投与後 6 時間までの、400 mg/kg 投与では投与後 24 時間までの尿中排泄量及び AUC の値をそれぞれ用いて求めた。

$$CL_r = X_{0-obs} / AUC_{0-obs} \quad (X: \text{尿中総排泄量})$$

$$CL_{nr} = CL_{tot} - CL_r$$

## 6. 統計解析

各製剤間の各薬物動態パラメータの平均値の差の有意差検定は、StatView J (Abacus Concepts, Inc.) を用い、Student の t-検定 (有意水準 5%) で行った。

## 第 II 章 実験の部

### II - 1. 薬剤性腎障害モデルの作製

#### 1. 試薬

塩化第二水銀 (和光純薬㈱、以下  $HgCl_2$ ) は市販の特級品を用いた。

#### 2. 薬剤性腎障害モデルの作製

9 週齢の SD 系雄性ラット (日本エスエルシー㈱) の背部に  $HgCl_2$  生食溶液 2 mg/kg (投与液量 2 ml/kg) を皮下投与後メタボリックケージ内で飼育し、 $HgCl_2$  投与 4 日目のラットを腎障害ラットとして試験に供した。飼育中は自由摂食 (実験動物用固形飼料、オリエンタル酵母工業㈱)・摂水とした。実験は、「動物実験に関する指針 (明治製菓㈱)」を遵守して行った。

#### 3. 血清及び尿の生化学検査

血清生化学検査は ROCHE COBAS FARA/FARA II を用い、GOT 及び GPT は UV 法、NEFA は ACS ACOD 法、TG は GPO・DAOS 法、Glu はグルコース脱水素法、BUN は Urease・GI 法及び  $C_{re}$  は Creatininase・TOOS 法でそれぞれ測定した。

尿生化学検査は ROCHE COBAS FARA/FARA II を用い、NAG は 2-クロル-4-

ニトロフェニル-N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミドを基質とした方法、LDH は Wroblewski-La Due 法、ALP は p-ニトロフェニルリン酸基質法、LAP は L-ロイシン-p-ニトロアニリド基質法、 $\gamma$ -GTP は包接 L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法でそれぞれ測定した。

## II-2. 薬剤性腎障害モデルによる薬物動態評価

### 1. 被験物質及び試薬

NM394 及び NAD-358 (内部標準物質) は日本新薬㈱で合成されたものを用い、イヌリン (nacalai tesque LTD.) は市販の特級品を用いた。その他の試薬も市販の特級品及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のものを使用した。

### 2. 投与液の調製

必要量の NM394 を 1M NaOH に溶解後 0.1M HCl で中和し、生食にて 2.5 mg/ml の溶液を調製した。イヌリンは生食にて 100 mg/ml となるように調製した。

### 3. 薬物動態試験

#### 3-1. 薬剤投与及び生体試料の採取

10 週齢の SD 系雄性ラット (正常群:  $291.8 \pm 16.3$  g、腎障害群:  $281.4 \pm 10.5$  g) にペントバルビタール麻酔下で大腿動脈及び頸静脈カニューレーション (BECTONDICKINSON CO., Ltd. PE50) を行い、外尿道部にシリンジを装着した。ラットをボールマンケージに固定し、ラットが覚醒後、NM394 5 mg/kg (投与液量 2 ml/kg) 及びイヌリン 100 mg/kg (投与液量 1 ml/kg) を頸静脈カニューレより投与し、予めヘパリン処理済みのサンプルチューブに経時的に大腿動脈カニューレより採取した。血液を低温下遠心分離し血漿を分取した。また、自然排泄尿を採取し、比重を 1 として重量から尿量を求めた。血漿及び尿試料は、薬物濃度測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存した。

### 3-2. 蛋白結合率測定

正常及び腎障害ラットのプール血清に NM394 の 0.5M NaOH 水溶液を添加し（血清容量の 1%）、NM394 濃度を 0.1、1、5、10 µg/ml 血清とした。同様に pH7.4 緩衝液（Sørensen buffer）で各濃度の試料を調製した<sup>59)</sup>。蛋白の分離は Centrifree<sup>®</sup>（MPS-3、YMT メンブレン、Amicon Co. Ltd.）を用いて限外ろ過法で行った。NM394 の濃度測定には各試料 0.1 ml を使用し、下式により蛋白結合率を求めた。

$$\text{蛋白結合率 (\%)} = (Y - X) / Y \times 100$$

X：血清ろ液中 NM394 濃度

Y：緩衝液ろ液中 NM394 濃度

### 3-3. 薬物動態解析

NM394 静脈内投与後の血漿中濃度推移の解析は、2-コンパートメントオープンモデルにあてはめ、非線形最小二乗法のアルゴリズムは Damping Gauss-Newton 法を用いて行った。なお、AUC は台形法で算出した。イヌリンの場合も同様に行った。薬物動態パラメータとして AUC<sub>0-obs</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>、T<sub>1/2</sub>、CL<sub>tot</sub> 及び Vd<sub>ss</sub> を求めた。CL<sub>r</sub> 及び CL<sub>nr</sub> を下式により算出し、非結合型腎外クリアランス（CL<sub>r</sub>/f）は CL<sub>r</sub> を非蛋白結合率（f=0.52）<sup>4)</sup> で除した。

$$CL_r = X_{0-obs} / AUC_{0-obs} \quad (X: \text{尿中総排泄量})$$

$$CL_{nr} = CL_{tot} - CL_r$$

### 3-2. 薬物濃度測定

NM394 の濃度は、採取した血漿、希釈した尿及び限外ろ過液 0.1 ml に 0.2 M リン酸緩衝液（pH7.0、NAD-358 を 1 µg/ml 含有）1 ml、1%クロロ炭酸エチル（ジクロロメタン溶液）5 ml を各々加え 10 分間振盪後、遠心分離した。有機層 4 ml を別の遠沈管に取り減圧下蒸発乾固した。残渣を 0.2 ml のメタノールに溶解し、HPLC 測定に供した。HPLC の測定条件は既報<sup>60)</sup>に準じた。イヌリンの測定は Dische と Borenfreund の方法<sup>61)</sup>に従い、比色法により行った。

#### 4. 統計解析

各製剤間の各薬物動態パラメータの平均値の差の有意差検定は、Student の t-検定（有意水準 5%）で行った。

### II-3. 慢性腎不全モデルの作製

#### 1. 実験動物

6 週齢の SD 系雄性ラット（体重約 200 g、日本エスエルシー㈱）を用いて、常法<sup>12、13)</sup>に従い 5/6Nx を作製し、2 週間の飼育（自由摂食・摂水）後薬物動態試験に使用した。実験期間中は実験動物用固形飼料（オリエンタル酵母工業㈱）を与えた。実験は、*Guidelines for Animal Experiments of Kyoto University* に則って実施した。

#### 2. 慢性腎不全モデルの作製

約 16 時間の絶食を施した 5/6Nx を、ネンブタール<sup>®</sup>注射液（大日本製薬㈱）で麻酔し（0.2 ml/100 g BW、腹腔内注射）、腹部から側腹部にかけて剃毛した。0.2% アクリノール消毒液を塗布後、肋骨弓下付近まで腹膜切開し、右側の片腎を露出させた。露出させた腎の腎動脈及び腎静脈を束ねて結紮し摘出した。反対側の腎臓を露出させ、腎動脈の分岐状態を確認し、結紮する分岐血管を決定した。2 箇所目標血管分岐をすくうようにして糸をかけて結紮し、腎臓の色調が変化した梗塞部分を確認後、腹膜筋層を絹糸で縫合した（4-0 絹糸）。皮膚の縫合部分に 0.2% アクリノール消毒液を塗布した。覚醒を確認後ケージに戻し、2 週間自由摂食・摂水状態で飼育した。このとき、同時にシャムを必要匹数作製した。シャムは腹膜切開を行うが、両方の腎はそのままの状態とした。

### II-4. 慢性腎不全モデルラットにおける点滴静注用バンコマイシン 0.5

#### 「MEEK」の薬物動態

#### 1. 被験物質及び試薬

点滴静注用バンコマイシン 0.5 「MEEK」（明治製菓㈱）及び塩酸バンコマ

イシン点滴静注用 0.5g（塩野義製薬㈱）は市販の製剤を使用した。

## 2. 投与液の調製

各被験物質に生食を加えて用時溶解し、VCM として 4 mg/ml 及び 8 mg/ml の濃度の投与液を調製した。

## 3. 薬剤投与及び生体試料の採取

第 I 章 実験の部 I-3. 5. 薬物動態試験 5-1 薬剤投与及び生体試料の採取に準じて行った。なお、80 mg/kg 投与群については投与 24 時間後の採血後直ちに腋窩動静脈切断により放血致死させ腎臓を採取した。病理検査用の腎臓は直ちに 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、測定まで-20℃以下で凍結保存した。

## 4. 薬物濃度測定

血漿及び尿中 VCM 濃度の測定は、TDX<sup>TM</sup>-バンコマイシン「アボット」キット（アボットジャパン㈱）を用い、TDX アナライザー<sup>®</sup> で測定する蛍光偏光免疫法（FPIA 法）で実施した。測定濃度範囲は 2~100 µg/ml で、試料の希釈は精製水で行った。腎臓中 VCM 濃度は腎臓重量を測定後、9 倍量の生食を加えて 10%ホモジネートを調製し（POLYTRON-Aggregate、PCU11 使用）、その試料をさらに生食で希釈後、血漿及び尿と同様に FPIA 法で測定した。測定濃度範囲は 5~50 µg/ml とした。

## 5. 薬物動態解析

第 I 章 実験の部 I-3. 5. 薬物動態試験 5-3.薬物動態解析に準じて行った。

## 6. 腎機能検査及び病理検査

腎機能の指標として BUN 及び C<sub>cr</sub>を用いた。すなわち、シャム及び 5/6Nx の

薬剤投与前の BUN 及び P-C<sub>re</sub> 濃度を測定した。また、シャム及び 5/6Nx の薬剤投与前 24 時間の蓄尿の U-C<sub>re</sub> 濃度を測定した。測定には、それぞれ尿素窒素 B テストワコー（和光純薬工業株）及びクレアチニンテストワコー（和光純薬工業株）のキットを使用した。P-C<sub>re</sub>、U-C<sub>re</sub> 及び尿量（比重 1 として重量から算出）から次式により C<sub>cr</sub> を算出した。

$$C_{cr} = Y_{0-24} / (P-C_{re} \times 24) / 60 \text{ (ml/min)} \quad (Y_{0-24} : \text{U-C}_{re} \text{ 総排泄量})$$

また、シャムと 5/6Nx への薬剤投与前及び 5/6Nx に各製剤 80 mg/kg を投与 24 時間後の腎臓について病理検査を行なった。病理検査は、常法に従い H-E 染色標本を作製して光学顕微鏡下で観察した。

## 7. 統計解析

腎機能検査項目 (BUN 及び C<sub>cr</sub>) の結果及び各薬物動態パラメータについて、Student の t-検定 (有意水準 0.05) で有意差検定を行なった。また、5/6Nx に MEEK 及び S-VCM を 40 mg/kg あるいは 80 mg/kg 投与したときの CL<sub>tot</sub>、CL<sub>r</sub>、CL<sub>nr</sub>、Vd<sub>ss</sub> 及び尿中排泄率について、薬剤及び投与量を要因とする二元配置分散分析による解析を行った。なお、いずれの統計解析も、SAS (SAS Institute Japan, Ver.8) を用いて行った。



## 引用文献

1. Shimizu K., Orizu M., Kanno H., Kitamura S., Konishi T., Soma K., Nishitani H., Noguchi Y., Hasegawa S. and Wada K. : Clinical studies on vancomycin in the treatment of MRSA infection. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 49(8), 782-799 (1996) .
2. Oguma T., Yano Y., Zaizen M., Botan Y., Iga T., Zenda H., Okumura K., Yasuhara M. and Hori R. : Statistical analysis of factors affecting efficacy and safety of vancomycin. *Chemotherapy*, 45(12), 987-994 (1997) .
3. Matzke G.R., Zhanel G.G. and Guay D.R.P. : Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clin Pharmacokinet*, 11, 257-282 (1986) .
4. Leader W.G., Chander Mary H.H. and Castiglia M. : Pharmacokinetic Optimization of Vancomycin Therapy. *Clin Pharmacokinet*, 28(4), 327-342 (1995) .
5. Japanese Patent Laid-open No.146825/1989.
6. Package Insert, VANCOMYCIN.
7. Package Insert, VANCOMYCIN for I.V. Infusion 0.5 「MEEK」 .
8. 宮本範文、程島直子、吉光寺敏泰、梶田俊之、高杉益充：点滴静注用バンコマイシン 0.5 「MEEK」 の物理化学的特性と安全性.：化学療法の領域、19(8), 118-124 (2003) .
9. Hodoshima N., Nakano Y., Izumi M., Mitomi N., Nakamura Y., Aoki M., Gyobu A., Shibasaki S. and Kurosawa T. : Protective effect of inactive ingredients against nephrotoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19(1) , 68-75 (2004) .
10. 程島直子、関子田健二、西島美奈子、中村由香利、芝崎茂樹、黒沢亨、増田智先、乾 賢一：日本薬剤学会第 18 年会講演要旨集、2003、p.242 .
11. Hodoshima N., Masuda S. and Inui K. : Decreased renal accumulation and toxicity of a new VCM formulation in rats with chronic renal failure. *Drug Metabol Pharmacokin*, 22(6), 419-427 (2007) .

12. 柴崎敏昭：医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、Vol.215(6)、p.489-494 (2005) .
13. 水沼博司、日高信子、東谷美生、日高哲郎、奥田秀毅：塩酸バンコマイシンの物理化学的性質および製剤の安定性ならびに配合変化．化学療法の領域、8(6), 98-106 (1992) .
14. Pfeiffer R.R. : Structural features of vancomycin. *Rev Infect Dis*, 3, suppl, S205-S209 (1981) .
15. 並木徳之、根岸 徹、加藤潤一郎、金子昌弘、坂倉光好：点滴静注用バンコマイシン 0.5「MEEK」の薬剤調製時における有用性の評価．新薬と臨床、51(7), 59-65 (2002) .
16. 医薬品添加物一覧表、社団法人東京医薬品工業協会・大阪医薬品協会資料 (1987) .
17. Decorti G., Klugmann F.B., Candussio L., Basa M., Mallardi F., Grill V. and Baldini L. : Effect of polyethylene glycol 400 on adriamycin induced histamine release. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22(7), 793-799 (1986) .
18. Horinouchi Y., Abe K., Kubo K. and Oka M. : Mechanisms of vancomycin-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *Agents Action*, 40, 28-36 (1993) .
19. Wittendorf, R.W., Swagzdis, J.E., Gifford, R. and Mico, B.A. : Protein binding of glycopeptides antibiotics with diverse physical-chemical properties in mouse, rat, and human serum. *J Pharmacokin Biopharm*, 15, 5-13 (1987) .
20. Animal scale up. In Hanano M., Umemura K., Iga T.(ed.) : Applied Pharmacokinetics Theory and Experiments, Soft Science, INC., p.474-51 (1985) .
21. Nakamura T., Takano M., Yasuhara M. and Inui K. : In vivo clearance study of vancomaycin in rats. *J Pharma Pharmacol*, 48, 1197-1200 (1996) .
22. Nakamura T., Kokuryo T., Takano M. and Inui K. : Reanal excretion of vancomaycin in rats with acute renal failure. *J Pharma Pharmacol*, 49, 154-157 (1997) .

23. Niizato T., Ohnishi M., Nishiyama S. and Asaoka H. : A study on nephrotoxicity of arbekacin and vancomycin in rats. *Jpn J Antibiot*, 47, 664-675 (1994) .
24. Nagai A., Nagasawa M., Kawamura Y., Kodama T., Yamada H., Minami S., Watanabe Y. and Narita H.: Protective effect of piperacillin against nephrotoxicity of vancomycin in rabbits. *CHEMOTHERAPY*, 42(6), 699-706 (1994) .
25. Sokol P.P. : Mechanism of vancomycin transport in the kidney: Studies in rabbit renal brush border and basolateral membrane vesicles. *J Pharm Exp Therap*, 259(3), 1283-1287 (1991) .
26. Rodvold K.A., Blum R.A., Fischer J.H., Zokufa H.Z., Rotschafer J.C., Cossley K.N.B. and Riff L.J. : Vancomycin pharmacokinetics in patients with various degrees of renal function . *Antimicro Agents Chemother*, 32(6), 848-852 (1988) .
27. 芝崎茂樹、栗林尚志、程島直子、仲由武實 : NM441 の腎排泄機構と腎障害ラットにおける体内動態の検討、日本化学療法学会雑誌、44(S-1), 165-172 (1996) .
28. Coe F.L. : Clinical and laboratory assessment of the patient with renal disease. Chapter 23, “*In The kidney*” edited by Brenner B.B. and Rector F.C., Jr. pp.1135-1180, Philadelphia, Saunders Company (1981) .
29. 酒井文徳 : 腎臓、トキシコロジー (浦口健二、上野芳夫、粕谷 豊、北川晴雄、酒井文徳編、p.473-483、地人書館、東京 (1978) .
30. 金井泉 (原著)、金井正光 (編著) : 臨床検査法提要、pp.1450、金原出版株式会社、東京、大阪、京都 (1993) .
31. Chanutin A. and Ferris E.B. : Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. I. *Control diet Arch Intern Med*, 49, 767-787 (1932) .
32. Shimamura T. and Morrison A.B. : A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*, 79, 95-106 (1975) .
33. Brenner B.M. : Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. *Kidney Int*, 23, 647-655 (1983) .
34. Campese V.M. : Neurogenic factors and hypertension in chronic renal failure. *J Nephrol*, 10, 184-187 (1997) .

35. Dautrey S., Rabbaa L., Laouari D., Lacour B., Carbon C. and Farinotti R. :  
Influence of renal failure on intestinal clearance of ciprofloxacin in rats.  
*Antimicrob Agents Chemother*, 43, 678-680 (1999) .
36. Kwon T., Hanger H., Nejsum L.N., Andersen M., Frokiaer J. and Nielsen S. :  
Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol*, 21,  
231-238 (2001) .
37. Hostetter T.H., Olson J.L., Rennke H.G., Venkatachalam M.A. and Brenner  
B.M. : Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to  
renal ablation. *American Physiological Society*, F85-F93 (1981) .
38. Takeuchi A., Masda S., Saito H., Doi T. and Inui K. : Role of kidney-specific  
organic anion transporters in the urinary excretion of methotrexate. *Kidney Int*,  
60, 1058-1068 (2001) .
39. 木村健二郎 : 腎と透析、臨時増刊号 31、pp.431-439、東京医学社株式会社  
(1991) .
40. Horiba N., Masuda S., Takeuchi A., Saito H., Okuda M. and Inui K. : Gene  
expression variance based on random sequencing in rat remnant kidney. *Kidney  
Int*, 66, 29-45 (2004) .
41. Masuda M.: Review, Functional characteristics and pharmacokinetic significance  
of kidney-specific organic anion transporters, OAT-K1 and OAT-K2, in the  
urinary excretion of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*, 18(2) , 91-103  
(2003) .
42. Nakamura N., Masuda S., Takahashi K., Saito H., Okuda M. and Inui K. :  
Decreased expression of Glucose and peptide transporters in rat remnant kidney.  
*Drug Metab Pharmacokinet*, 19(1) , 41-47 (2004) .
43. Ji L., Masuda S., Saito H., Inui K. : Down-regulation of rat organic cation  
transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int*, 62, 514-524 (2002) .
44. Takahashi K., Masuda S., Nakamura N., Saito H., Futami T., Doi T., Inui K. :  
Upregulation of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter PEPT2 in rat remnant kidney. *Am J*

- Physiol Renal Physiol*, 281, F1109-F1116 (2001) .
45. Nishihara K., Masuda S., Ji L., Katsura T., Inui K. : Pharmacokinetic significance of luminal multidrug and toxin extrusion 1 in chronic renal failure rats. *Biochem Pharmacol*, 73, 1482-1490 (2007) .
  46. Takenaka T., Watanabe T., Hayashi T., Hata K., Ono N., Kumon H. and Ohmori H. : Pharmacokinetics of vancomycin and dosage planning in patients with renal insufficiency. *Chemotherapy*, 41(10), 1079-1089 (1993) .
  47. Nakamura T., Kokuryo T., Okuda M., Hashimoto Y. and Inui K. : Effects of arbekacin and vancomycin on release of lactate dehydrogenase and fragmentation of DNA in LLC-PK<sub>1</sub> kidney epithelial cells. *Pharmaceutical Research*, 16(7), 1132-1135, (1999) .
  48. Fanos V. and Cataldi L. : Renal Transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review: *Journal of Chemotherapy*, 13(5), 461-472 (2001) .
  49. Nakamura T., Hashimoto Y., Kokuryo T. and Inui K. : Effects of fosfomycin and imipenem/cilastatin on nephrotoxicity and renal excretion of vancomycin in rats. *Pharmaceutical Research*, 15(5), 734-738 (1998) .
  50. Toyoguchi T., Takahashi S., Hosoya J., Nakagawa Y. and Watanabe H. : Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), 1985-1990 (1997) .
  51. Nakamura T., Kokuryo T., Hashimoto Y. and Inui K. : Effects of fosfomycin and imipenem-cilastatin on the nephrotoxicity of vancomycin and cisplatin in rats. *J Pharm Pharmacol*, 51(2), 227-232 (1999) .
  52. Florian Lang: Osmotic diuresis. *Renal Physiol*, Basel 10 , 160-173 (1987) .
  53. Behnia R., Koushanpour E. and Brunner E.A. : Effect of hyperosmotic mannitol infusion on hemodynamics of dog kidney. *Anesth Analg* , 82, 902-908 (1996) .
  54. Haraldsson G., Sörensen V., Nilsson U., Pettersson S., Rashid M., Schersten T., Akerlund S. and Jonsson O. : Effect of pre-treatment with desferrioxamine and mannitol on radical production and kidney function after ischaemia-reperfusion.

- A study on rabbit kidneys. *Acta Physiol Scand*, 154 , 461-468 (1995) .
55. Zager R.A., Foerder C. and Bredl C. : The influence of mannitol on myoglobinuric acute renal failure: Functional, biochemical, and morphological assessments. *J Am Soc Nephrol*, 2 (4), 848-855 (1991) .
56. Igarashi M., Nakatani R., Hayashi M., Nakata K. and Kasuya Y. : Accuracy assessment of vancomycin serum concentrations predicted by population pharmacokinetic parameters and the Bayesian method. *Chemotherapy*, 50(6), 363-370 (2002) .
57. Nakamura T., Wakaki N., Kimura Y., Goto N. and Masada M. : Bayesian forecasting of plasma vancomycin concentration using time-dependent pharmacokinetics. *Yakugaku Zasshi*, 116(11), 876-883 (1996) .
58. Magnusson K., Svensson I., Gustavsson B., and Enerbäck L. : Effect of polyethyleneglycol (PEG) on spontaneous and polymyxin B-Induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *Cell Biophys*, 4, 245-252 (1982) .
59. Morino A., Okuyama Y., Momota K., Ohyabu M., Ushimaru K. : Pharmacokinetics of NM441, a new quinolone, in laboratory animals. 32<sup>nd</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, October, (1992) .
60. 芝崎茂樹、栗林尚志、程島直子、仲由武實：イヌにおける NM441 の脳脊髄液中濃度推移の検討。日本化学療法学会誌、44(S-1), 160-164 (1996) .
61. Dische E., Borenfreund E. : A new spectrophotometric method for detection and determination of keto sugars and trioses. *J Biol Chem*, 192, 583-587 (1951) .